

UNIVERSITÉ DE GENÈVE

Département de biologie végétale

Microbiologie générale

FACULTÉ DES SCIENCES

Professeur G. TURIAN

HYPERSENSIBILITÉ AU VIRUS DE LA MOSAIQUE DU TABAC CHEZ DIVERS NICOTIANA

EFFET THERMIQUE ET PROTÉINES SOLUBLES

THÈSE

présentée à la Faculté des Sciences

de l'Université de Genève

pour obtenir le grade de docteur-ès-sciences biologiques

par

Silvio GIANINAZZI

de

Cadempino (TI)

Thèse N° 1547

Dijon

Station de Physiopathologie I.N.R.A.

1970

UNIVERSITÉ DE GENÈVE

Département de biologie végétale
Microbiologie générale

FACULTÉ DES SCIENCES

Professeur G. TUVIAN

HYPERSENSIBILITÉ AU VIRUS DE LA MOSAÏQUE DU TABAC CHEZ DIVERS NICOTIANA

EFFET THERMIQUE ET PROTÉINES SOLUBLES

Digitized by the Internet Archive
in 2026

présentée à la Faculté des Sciences

de l'Université de Genève

pour obtenir le grade de docteur-ès-sciences biologiques

par

SILVO GIANINAZZI

de

Genève 1976

N° 1347

Dépt.

https://archive.org/details/IA41545925_0039

1976

UNIVERSITÉ DE GENÈVE

Département de biologie végétale
Microbiologie générale

FACULTÉ DES SCIENCES

Professeur G. TURIAN

HYPERSENSIBILITÉ AU VIRUS DE LA MOSAIQUE DU TABAC CHEZ DIVERS NICOTIANA

EFFET THERMIQUE ET PROTÉINES SOLUBLES

THÈSE

présentée à la Faculté des Sciences

de l'Université de Genève

pour obtenir le grade de docteur-ès-sciences biologiques

par

Silvio GIANINAZZI

de

Cadempino (TI)

Thèse N° 1547

Dijon

Station de Physiopathologie I. N. R. A.

1970

La faculté des sciences, sur le préavis du professeur C. TURIAN, directeur de thèse, et d'une commission composée du professeur C. MARTIN (directeur de la station de Physiopathologie INRA Dijon), des professeurs J. MIEGE et H. GREPPIN, des Drs R. BOVAY (directeur de la station agronomique fédérale) et R. CORBAZ (privat-docent), autorise l'impression de la présente thèse, sans exprimer d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

GENEVE, le 21 décembre 1970

Le Doyen : Marc VUAGNAT

Thèse --- 1547 ---

"L'initiale coexistence pacifique de l'hôte et du parasite conduit lorsque les parties s'affrontent :

- soit à la destruction partielle ou totale de l'hôte
- soit à l'élimination du parasite par des mécanismes de défense divers".

G.L. FARKAS

J'adresse mes remerciements au Professeur G. TURIAN qui a bien voulu me faire l'honneur d'assumer la présidence du jury.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance au Professeur C. MARTIN, Directeur du Laboratoire de Physiopathologie Végétale de l'I.N.R.A. de Dijon (France) qui a bien voulu m'accueillir dans son laboratoire pour la réalisation du présent travail.

Mes remerciements vont aussi à tout le personnel du Laboratoire de Physiopathologie Végétale et en particulier à Madame J. RIGAUD et à Messieurs SCALLA, J.C. VALLEE et R. VERNY pour la collaboration apportée et pour l'ambiance de cordiale sympathie qu'ils ont contribué à faire régner et sans laquelle ce travail n'aurait pu être mené à bien.

S O M M A I R E

-:-:-

	PAGES
- INTRODUCTION.....	5
- HISTORIQUE.....	13
- NOTE : "Hypersensibilité aux virus, température et protéines solubles chez le <u>Nicotiana Xanthi</u> n.c.".....	17
- NOTE : "Température et synthèse de matériel protéique viral chez le <u>Nicotiana Xanthi</u> n.c. infecté par le Virus de la Mosaïque du Tabac.".....	23
- COMPLEMENT I.....	26
- NOTE : "Biosynthèse de la capsid du Virus de la Mosaïque du Tabac chez le <u>Nicotiana Xanthi</u> n.c. à 32°C.".....	27
- ARTICLE : "Etude de la synthèse protéique chez <u>Nicotiana tabacum</u> var. <u>Xanthi</u> n.c. au cours de la réaction hypersensible au Virus de la Mosaïque du Tabac.".....	33
- NOTE : "Hypersensibilité aux virus, température et protéines solubles chez le <u>Nicotiana Xanthi</u> n.c.. Apparition de nouvelles macromolécules lors de la répression de la synthèse virale.".....	60
- ARTICLE : "Mise en évidence de nouvelles protéines lors de l'infection virale chez divers <u>Nicotiana</u> .".....	66
- COMPLEMENT II.....	94
- CONCLUSION ET DISCUSSION.....	98
- BIBLIOGRAPHIE.....	103

-:-:-

I N T R O D U C T I O N

-:-:-:-:-

Depuis quelques années les études de déviations métaboliques des plantes infectées par différents virus ont été particulièrement nombreuses. Le but de ces recherches était de mettre en évidence, dans le métabolisme de l'hôte, des altérations spécifiques selon les différents types de réactions présentées par la plante lors de l'attaque par le parasite, y compris les cas de résistance. Parmi ces différents types d'interactions hôte/parasite, la plus grande attention, lors de ces études, a été dirigée vers les processus biochimiques associés ou responsables de la formation des lésions locales nécrotiques et aux déviations métaboliques liées au développement des symptômes de mosaïque. La plupart des travaux effectués ont porté sur les petites molécules (glucides, acides aminés, acides organiques, composés phénoliques) ainsi que sur la respiration et la photosynthèse. Peu de travaux ont été entrepris sur les protéines de l'hôte ; l'activité de quelques enzymes particulières (peroxydases, polyphénoloxydases, cytochrome-oxydase, phospho-gluconate deshydrogénase) a, par exemple, été l'objet d'un certain nombre de travaux.

Malgré ces recherches on n'a pas pu tirer des conclusions générales et FARKAS (1967), à ce propos, s'exprimait ainsi :

- "The reason for this apparent failure is that the invasion of plant tissues by parasites is associated with a number of non-or semi-specific metabolic alterations which "dominate" the metabolic pattern of the diseased tissues to such an extent that they easily screen off the less "striking" but more specific alterations. Consequently, our knowledge grew more rapidly in the "non specific" than in the "specific" field. ..In addition, it became evident that these "non specific" alterations represent exciting examples of metabolic regulation. Thus, their study is of general interest".

C'est en gardant à l'esprit cette réflexion que nous avons commencé notre travail sur le métabolisme des protéines chez les plantes saines

et virosées. Nos recherches ont été entreprises dans trois directions :

- 1) Etude de la synthèse de la protéine de la capside.
- 2) Etude des conséquences de l'infection virale sur la synthèse des protéines normales de la plante.
- 3) Etude de la réaction de la plante infectée : recherche d'une éventuelle synthèse de protéines spécifiques de type "interferon" lui permettant de résister à l'infection virale.

Le choix du parasite a porté sur le virus de la mosaïque du tabac (V.M.T.). Il possède un seul type de capsomère et son matériel génétique est de l'acide ribonucléique monocaténaire. Sa replication semble se faire en passant par la synthèse d'une chaîne complémentaire avec formation d'une double hélice (forme replicative) réalisée entre le brin d'acide ribonucléique parental (+) et la chaîne complémentaire (-) (Montagnier et Sanders 1963 ; Baltimore Becker et Darnell 1964). Cette forme intermédiaire à double chaîne permet ainsi de reproduire des molécules d'acide ribonucléique identiques au brin parental (+). (Weissmann, Borst, Burdon, Billeter et Ochoa 1965). Le fonctionnement de la forme replicative semble avoir besoin de deux enzymes différentes (replicases). Une des deux enzymes servirait à la lecture de l'acide ribonucléique parental (+) pour former le brin complémentaire (-) (Weissmann 1965) et l'autre permettrait la transcription du brin (-) de la forme replicative en acide ribonucléique viral néosynthétisé (Baltimore et Franklin 1962 ; Horana, Nozu, Ohtaka et Spiegelman 1963 ; Weissmann, Simon et Ochoa 1963). L'acide ribonucléique viral (+) joue le rôle d'acide ribonucléique messenger, et doit contenir l'information génétique de(s) replicase(s) et de la protéine du manteau.

Comme hôte, nous avons choisi le Nicotiana tabacum variété Samsun et le Nicotiana tabacum var. Xanthi n.c. Ces deux tabacs présentent à 20°C, à l'égard du virus de la mosaïque du Tabac, deux réactions différentes. Chez le Nicotiana tabacum variété Samsun l'infection est systémique (généralisée) et non nécrotique : le virus se multiplie abondamment et envahit toute la plante qui reste pourtant vivante. Seul le méristème apical

ne contient pas de virus (Morel, Martin 1952). Chez le Nicotiana tabacum var. Xanthi n.c. l'infection est localisée et nécrotique. Cette réaction est dite d'hypersensibilité : le virus provoque la formation de plages de cellules infectées (lésions locales nécrotiques), sa multiplication est rapidement arrêtée et le développement systémique du parasite est empêché. L'arrêt de la multiplication n'est pas dû à la formation d'une barrière de cellules mortes (comme le supposaient certains auteurs), car il existe du virus biologiquement actif dans les cellules vivantes situées au-delà de la nécrose (Martin et Gallet 1966 a, b et c), mais à une autre barrière, que nous ne sommes pas encore en mesure de définir, telle que ces cellules sont incapables de répondre complètement à l'information génétique que possède l'acide ribonucléique viral. Cette propriété du Nicotiana tabacum var. Xanthi n.c. est liée à la présence d'un gène "N", dit gène de l'hypersensibilité. Nicotiana tabacum variété Samsun est porteur à ce locus de l'allèle récessif "n".

Ce type de réaction peut être supprimé en plaçant le tabac hypersensible au virus de la mosaïque du tabac à des températures élevées (Samuel 1931). A ces températures (30-32°C) la réaction d'hypersensibilité (nécrose) n'a pas lieu et le virus peut imposer son information génétique à la cellule : l'infection devient systémique (généralisée) comme chez un hôte sensible. L'élévation de la température crée donc des conditions permettant à la maladie de se développer chez un individu présentant à température normale (20-25°C) une forme de résistance grâce au gène d'hypersensibilité. En d'autres termes, une plante portant le gène N réagit aux températures élevées comme un individu qui porte l'allèle récessif "n".

La suppression de l'hypersensibilité à des températures élevées est réversible (Kassanis 1952) ; de plus, il suffit de ramener les plantes infectées à 20-28°C pour que la réaction hypersensible soit à nouveau déclenchée, à condition que le virus soit en voie de multiplication (Martin et Gallet a, b, et c). En modifiant la température, on passe ainsi d'un type de réaction à l'autre.

Par la rapidité et la netteté des réactions mises en jeu, le sys-

tème "Nicotiana porteur du gène N-VMT-Température" est particulièrement intéressant pour aborder l'étude de l'action pathogène des virus et la régulation de leur biosynthèse. (Fig. 1, 2, 3 et 4).

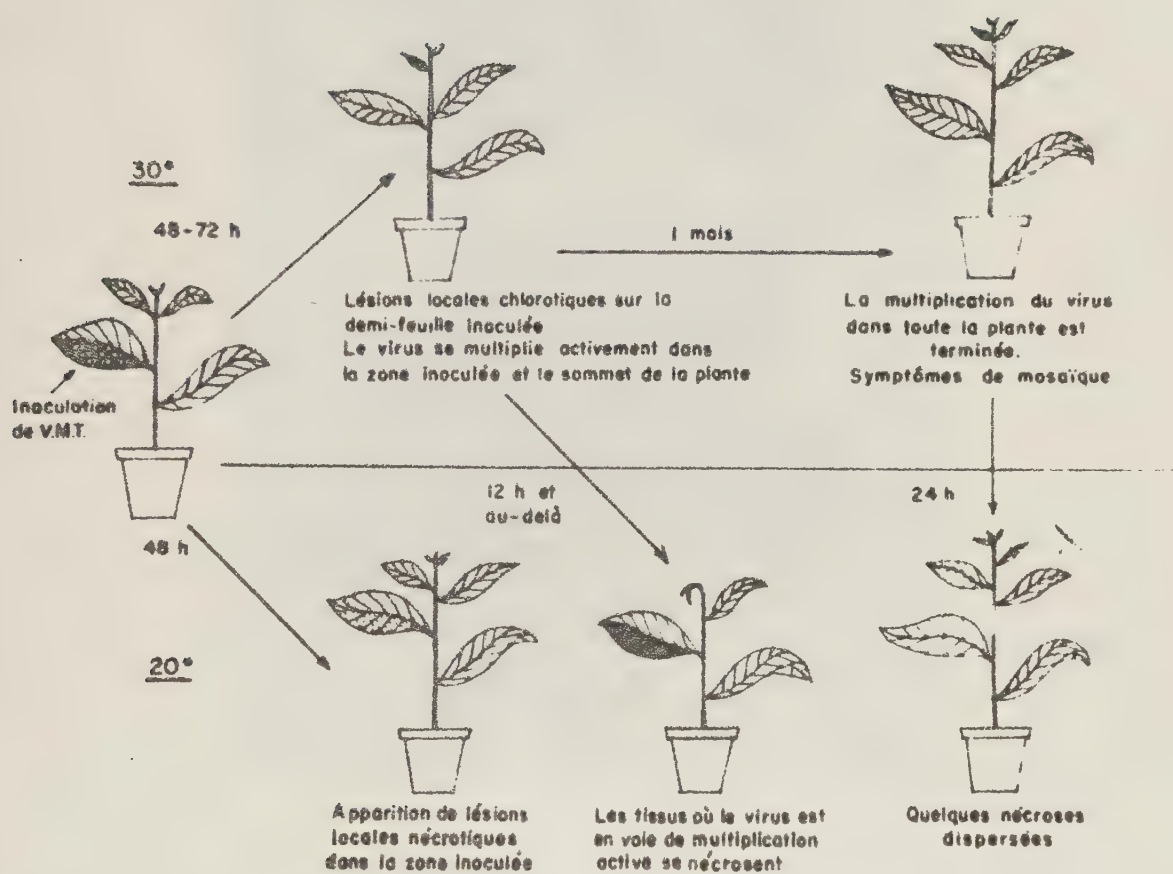


Fig. 1. - D'après R. SCALLA et R. MEIGNOZ.
Ann. Physiol. vég. 1967, 9 (4), 383 - 396



Fig. 2 - Nicotiana tabacum var. Xanthi n. c.
- a) sain à 30°C
- b) malade à 30°C : 16 jours après infection par le V.M.T. : symptômes de mosaïque.



Fig. 3 - Nicotiana tabacum var. Xanthi n. c.

- a) sain à 20°C
- b) malade à 20°C : 3 jours après infection par le V.M.T. : lésions locales nécrotiques.



Fig. 4 - Nicotiana tabacum var. Xanthi

- a) sain
- b) malade : 3 jours après infection à 30°C par le V.M.T., la plante est transférée à 20°C : nécrose totale de la demi-feuille inoculée et du sommet.

H I S T O R I Q U E

-:-:-:-:-

En 1902, WARD découvre, le premier, le phénomène d'hypersensibilité en tant que mécanisme de défense de la plante contre les parasites. Il s'agit d'une forme héréditaire de résistance (Biffen 1907), contrôlée par un ou plusieurs gènes (Stakmann 1914 et 1915 ; Holmes 1938) et qui peut être inhibée à des températures élevées (Samuel 1931).

Ces concepts acquis, les recherches sur l'hypersensibilité ont porté essentiellement sur l'étude des déviations du métabolisme normal de la plante après inoculation et en cours du développement de la maladie. L'observation des tissus broyés de plante malade brunissant plus rapidement que ceux des plantes saines (Woods 1899) a orienté toute une série de travaux vers l'étude des enzymes jouant un rôle dans les phénomènes d'oxydations. C'est ainsi qu'une augmentation remarquable de la peroxydase et de la polyphénoloxydase a été mise en évidence lors de l'apparition des lésions locales nécrotiques (Martin 1958 ; Farkas, Kiraly et Solymosy 1960). Mais il est rapidement apparu que l'augmentation des oxydases en général et de la polyphénoloxydase en particulier est un phénomène général aux plantes malades y compris dans les cas d'hypersensibilité aux champignons et aux bactéries (Uritani 1965 ; Stahmann 1965 ; Farkas, Solymosy et Lovrekovich 1965) ; on a alors pensé pouvoir expliquer la réaction d'hypersensibilité de la manière suivante : la polyphénoloxydase oxyde les phénols en quinones ; ces quinones toxiques tuent les cellules malades et arrêtent ainsi l'expansion du parasite. Cependant, comme le fait remarquer Barden (1964) à propos des infections virales, l'oxydation des phénols corrélative de la nécrose peut être aussi bien la cause que la conséquence de la mort des cellules malades. De plus, certaines expériences sont en désaccord avec cette interprétation : comme l'a montré Jockush (1966) : si l'on provoque par blessure une hyperactivité de la polyphénoloxydase, l'apparition des lésions locales n'est pas accélérée, mais au contraire retardée. D'autre part, les travaux de Cabanne, Scalla et Martin (1968) ont montré clairement que les symptômes nécrotiques de la réaction hypersensible apparaissent avant que l'activité de la polyphénoloxydase dépasse celle de la plante saine.

Le dosage en fonction du temps des composés phénoliques a montré aussi qu'il n'y a aucune accumulation ou production de nouveaux composés avant que la réaction d'hypersensibilité soit irréversible (Tanguy 1970).

Par ailleurs, des observations au microscope électronique ont révélé qu'il existe du virus, apparemment intact, dans les cellules entourant des lésions locales (Milne 1966) ainsi que vraisemblablement des virions incomplets ayant un pouvoir infectieux (Martin, Scalla, Meignoz et Gallet 1969). Ces résultats et le fait qu'il soit possible de généraliser l'infection une fois que la réaction d'hypersensibilité est acquise (Martin et Gallet a, b et c) ont permis de montrer d'une manière irréfutable que l'arrêt de la multiplication virale dans un hôte hypersensible ne peut pas être dû à une barrière de cellules mortes, mais à un autre mécanisme jusqu'à ce jour inconnu.

L'activité d'autres enzymes dans les tissus entourant la nécrose, a aussi été étudiée ; en particulier celle de la glucose-6- phosphate deshydrogénase et de la 6-phosphogluconate deshydrogénase (Solymosy et Farkas 1963). Ces deux enzymes du cycle des phospho-pentoses présentent lors de la réaction hypersensible une activité plus importante que normalement. Ceci indique, avec la diminution du rapport C6/CI (Loebenstein et Linsey 1963), une orientation du métabolisme de la glycolyse vers la voie des pentoses qui, par voie de conséquence, pourrait expliquer l'augmentation d'activité de la polyphénoloxydase lors de la réaction d'hypersensibilité.

D'autres travaux sur le métabolisme ont été effectués au niveau de la respiration et de la photosynthèse.

L'étude de la respiration a montré que lors de la réaction d'hypersensibilité le taux respiratoire est fortement augmenté avant l'apparition des symptômes (Weintraub, Kemp et Ragetli 1960), ce qui va de pair avec les observations faites au microscope électronique montrant une augmentation du nombre de mitochondries (Weintraub et Ragetli 1964). Quant à la photosynthèse, son intensité décroît avant l'apparition des lésions locales

nécrotiques (Scalla, Rigaud et Martin 1970). Cette diminution est accompagnée d'une désorganisation du système lamellaire des chloroplastes (Scalla, Meignoz, Noirot-Thimothee et Martin 1969) ainsi que d'un ralentissement de l'incorporation de phosphore minéral dans les composés organiques (Scalla et Meignoz 1967). Signalons cependant que cette baisse de phosphorylation semble contredite par les résultats de Ladygina, Rubin et Tukeeva (1960) et de Sunderland et Merret (1967) qui trouvent une augmentation de l'ATP après l'apparition des lésions locales. Mais cette contradiction n'est qu'apparente car ces auteurs ont travaillé sur des feuilles à lésions locales, composées en partie de tissus sains, alors que Scalla et Meignoz ont utilisé des feuilles en voie de nécrose à peu près totale grâce au système de transfert thermique 30°C-20°C décrit par Martin et Gallet. Enfin, les travaux de Ragetli (1967), qui ont montré une augmentation de l'activité de la phosphatase acide juste avant que les lésions locales nécrotiques soient visibles, confirment d'une façon indirecte les résultats de Scalla et Meignoz.

Un autre chapitre important, concernant les modifications du métabolisme chez les plantes hypersensibles, est celui relatif à la mise en évidence de molécules analogues à l'interferon. Les travaux dans ce domaine ont reçu une attention particulière depuis qu'il a été possible de démontrer, à la suite d'une infection primaire, le développement d'une résistance dite "acquise" dans certaines parties de la plante restée saine (Gilpatrick et Weintraub 1952, Yarwood 1953 et 1960 ; Ross 1961 a et b) mais surtout depuis que Bozarth et Ross (1964) ont montré que le développement de la résistance acquise dépend du déplacement d'une ou plusieurs substances issues de la feuille infectée. C'est ainsi que des extraits actifs à partir des feuilles présentant cette résistance se sont révélés inhibiteurs puissants du nombre de lésions locales. Des essais de purification ont permis de suggérer que la substance inhibitrice était une protéine de faible poids moléculaire (Loebenstein et Ross 1963 ; Loebenstein, Rabina et Van Praagh 1965) ou bien de nature ribonucléique (Sela, Harpaz et Birk 1966 ; Kimmins 1969).

Récemment, nous avons montré par électrophorèse, en même temps que des chercheurs néerlandais, l'apparition de nouvelles protéines dans les

tissus entourant la nécrose (Gianinazzi, Vallée et Martin 1969 ; Gianinazzi, Martin et Vallée 1970 ; Van Loon et Van Kammen 1970). Ces travaux seront décrits ultérieurement, mais il nous faut d'abord relater certains résultats concernant la synthèse de la capside virale, acquis au cours d'essais préliminaires. Ces recherches ont fait l'objet des trois notes qui suivent.

C.R. Acad. Sc. Paris, t. 268, p. 800-802 (3 février 1969)

Série D.

PHYSIOLOGIE VEGETALE. - Hypersensibilité aux virus, température et protéines solubles chez le Nicotiana Xanthi n. c. Note de M. Silvio GIANINAZZI, Jean-Claude VALLEE et Claude MARTIN, présentée par M. Lucien PLANTEFOL.

L'étude par électrophorèse des protéines solubles, en fonction de la température, chez le Nicotiana tabacum variété Xanthi, hypersensible au virus de la mosaïque du Tabac, montre qu'il y a des différences, soit qualitatives, soit quantitatives entre plantes saines et malades à 20°C et à 30°C.

Nous savons (1), (2), (3), que si on place des plantes de Nicotiana tabacum variété Xanthi à la température de 30°C, il est possible d'inhiber l'hypersensibilité au virus de la mosaïque du Tabac (V.M.T.), ainsi que le déclenchement des processus floraux.

Le phénomène d'hypersensibilité, qui se traduit aux températures inférieures à 28-29°C par l'apparition d'une petite plage nécrotique autour du point de pénétration du virus, limite le développement systémique du parasite. Cet arrêt de multiplication virale n'est pas dû à une barrière de cellules mortes, car il existe du virus biologiquement actif dans les cellules vivantes situées au-delà de la nécrose, mais à une autre barrière, que nous ne sommes pas encore en mesure de définir, telle que ces cellules sont incapables de répondre complètement à l'information génétique que possède l'acide ribonucléique viral. L'élévation de température lève cette incapacité. Nous avons donc pensé qu'une étude des protéines chez des plantes saines et malades à 20°C et à 30°C pourrait nous apporter quelques éclaircissements sur la nature de cette inhibition thermosensible.

Nous avons commencé par une étude statique du phénomène, limitée à des comparaisons au niveau des protéines solubles entre feuilles malades et saines à 20°C et à 30°C. Pour cela, nous avons procédé comme suit : deux lots de Nicotiana tabacum variété Xanthi, pris au stade végétatif, sont placés en chambre climatisée à 20°C et deux autres à 30°C (autres conditions des chambres climatisées : intensité lumineuse 16 000 lx, photopériode de 16 h, hygrométrie 70 %).

Un lot dans chaque chambre est inoculé mécaniquement avec une solution de V.M.T. ($20 \mu\text{g/ml}$) à raison d'une feuille par plante. 72 h après, les feuilles inoculées ainsi que les feuilles témoins sont prélevées et leurs protéines solubles extraites soit par la méthode de Staples et Stahmann (4) (broyage au mortier à 0°C dans du tampon tris-HCl $0,1 \text{ M}$, $0,5 \text{ M}$ saccharose, $0,1 \%$ acide ascorbique, $0,1 \%$ cystéine-HCl, $\text{pH} = 8,0$, centrifugation à $40\,000 \text{ g}$ pendant 60 mn et dialyse) soit par celle de la poudre acétonique (broyage dans l'acétone à -20°C , séchage de la poudre, reprise dans du tampon tris-HCl $0,1 \text{ M}$, $0,5 \%$ KCN, $\text{pH} = 7,5$, centrifugation, ultrafiltration sous azote). Les solutions de protéines obtenus sont étudiées par électrophorèse en gel de polyacrylamide selon la méthode de Ornstein (5) et Davis (6).

Les diagrammes ainsi obtenus par électrophorèse présentent des différences entre plantes saines et malades à 20°C et à 30°C (fig. 1 et schéma 1 et 2). En particulier, on note à 30°C une importante variation quantitative de la (ou de(s) bande(s) nommée(s) ici a. Par contre à 20°C , et à 20°C seulement, on voit apparaître chez la plante malade une bande que nous avons nommée b. Celle-ci qui est bien visible sur les gels après extraction des protéines par la méthode de la poudre acétonique, est très peu marquée lorsqu'on utilise la méthode de Staples et Stahmann. Il existe d'ailleurs quelques autres différences selon le procédé utilisé : en particulier, on constate la disparition, lors de l'extraction par la poudre acétonique, d'une bande (bande c) très marquée obtenue par la technique de Staples et Stahmann. Ceci peut s'expliquer en supposant que :

1. Nous n'extrayons pas le même type de protéines avec les deux méthodes, ou nous les extrayons dans des proportions différentes ;
2. Il est probable qu'avec l'une ou l'autre méthode certains types de protéines sont dénaturés.

Ceci dit, il apparaît cependant remarquable que certaines différences mises en évidence avec une méthode semblent être confirmées par l'autre. Nous pensons en particulier aux bandes a et a' et b et b'. Nous pouvons dire que le procédé de la poudre acétonique favorise la mise en évidence de ces bandes et nous permet d'extraire ces deux types de protéines en quantité relativement élevée. Par contre, la limite de cette technique par rapport à celle de Staples et Stahmann réside dans le fait que les diagrammes électrophorétiques obtenus

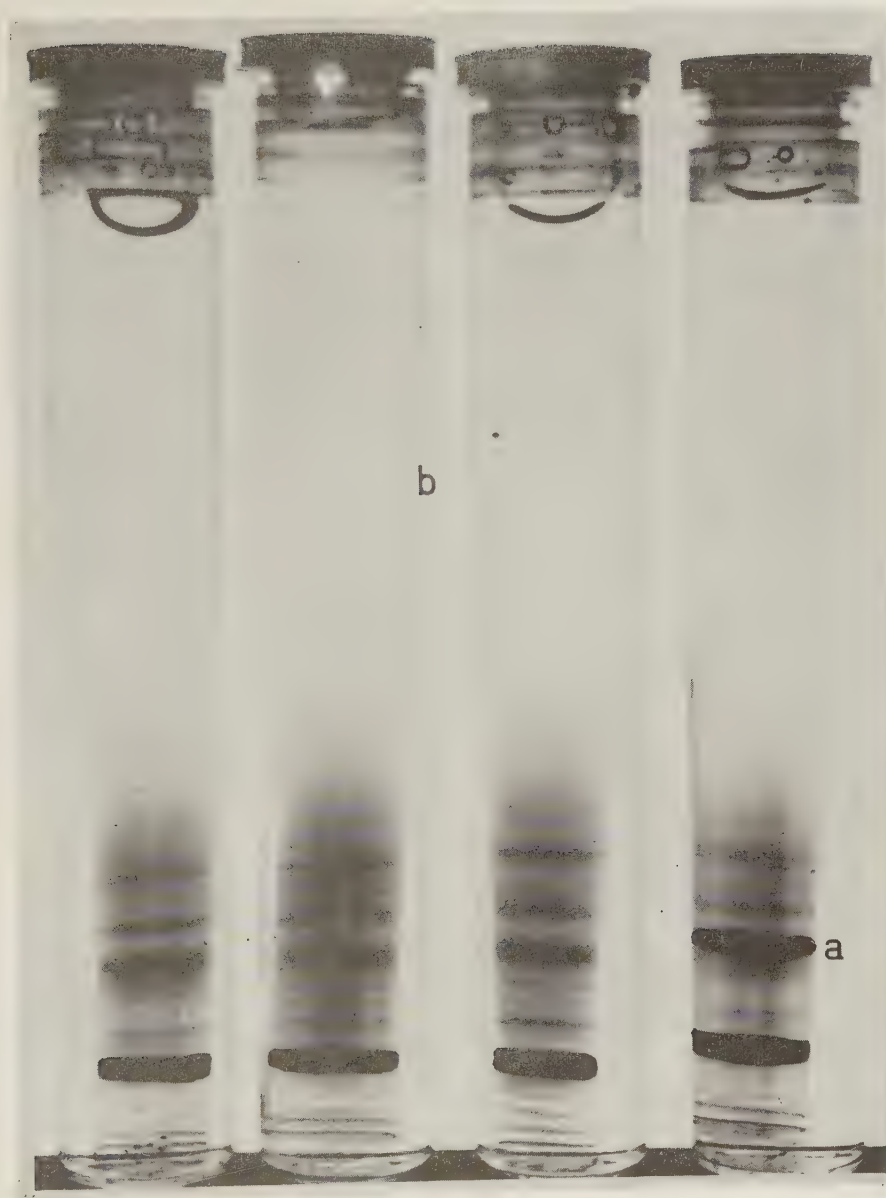


Fig. I - Comparaison par électrophorèse des extraits de protéines solubles de feuilles de plantes saines et malades obtenus par la méthode de Staples et Stahmann. De gauche à droite : plante saine à 20°C, plante malade à 20°C, plante saine à 30°C et plante malade à 30°C.

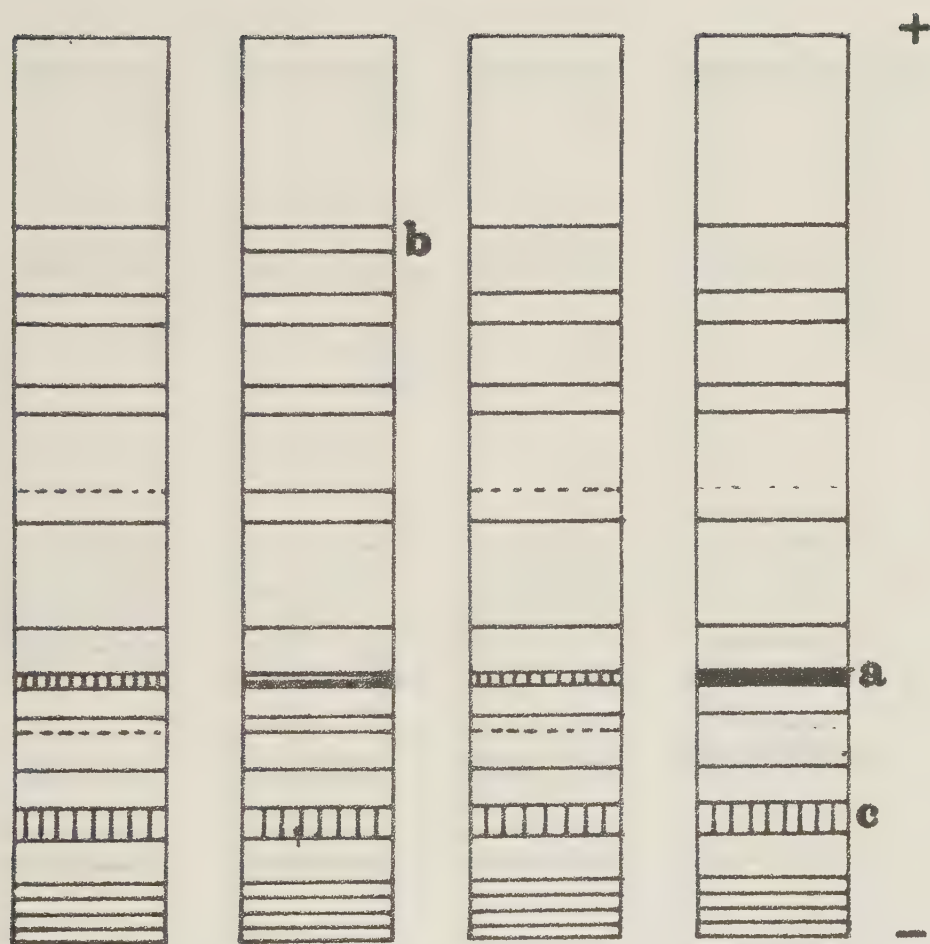


Schéma I. - Comparaison par électrophorèse des extraits de protéines solubles de feuilles de plantes saines et malades obtenus par la méthode de Staples et Stahmann. De gauche à droite : plante saine à 20°C, plante malade à 20°C, plante saine à 30°C et plante malade à 30°C.

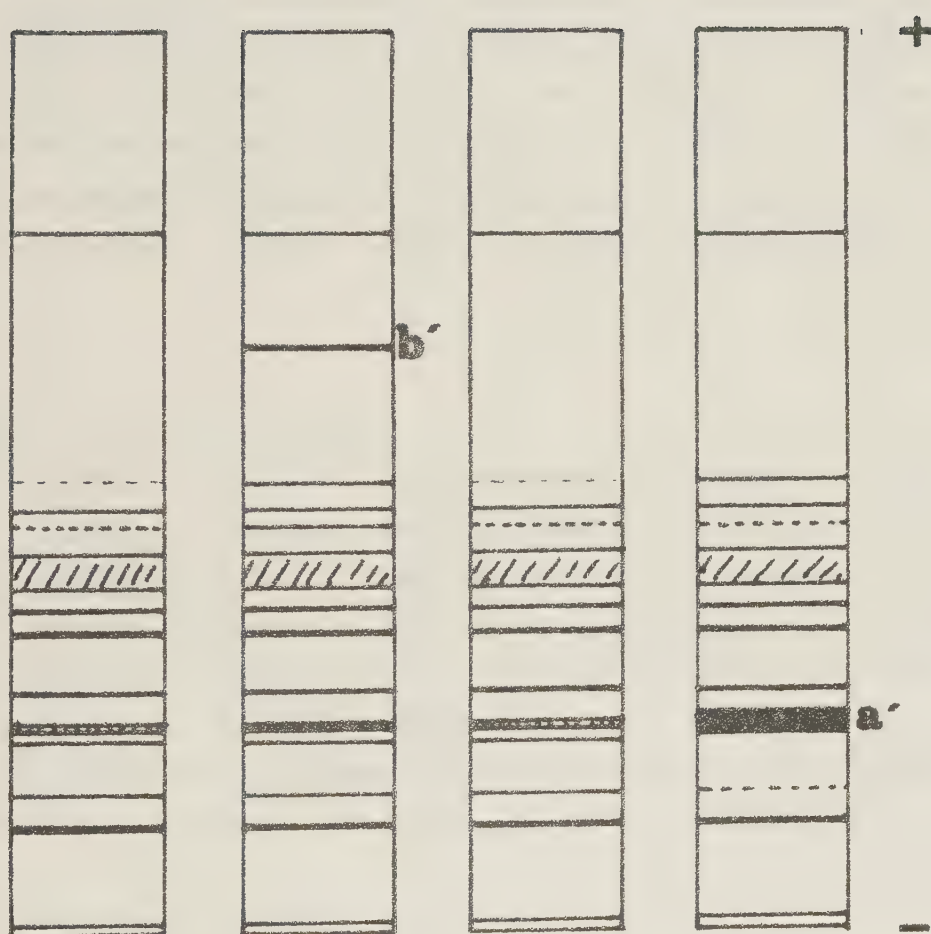


Schéma 2. - Comparaison par électrophorèse des extraits de protéines solubles de feuilles de plantes saines et malades obtenus par la méthode de la poudre acétonique. De gauche à droite : plante saine à 20°C, plante malade à 20°C, plante saine à 30°C et plante malade à 30°C.

sont moins nets. En effet, cette dernière nous permet une meilleure résolution grâce à une moindre coloration du gel de polyacrylamide.

Il semble donc intéressant de poursuivre cette étude avec les deux méthodes, car si l'une nous permet une séparation plus fine, l'autre nous permet de récupérer en quantité supérieure un certain nombre de protéines, en particulier a' et b' en vue d'une étude ultérieure.

En conclusion, il apparaît que, d'une part, la présence du virus, d'autre part, la température, affectent la nature des protéines solubles des feuilles de Tabac. Il sera intéressant de voir si ces différences à 20°C entre plantes saines et malades sont antérieures ou non à l'apparition de la nécrose et si l'inhibition thermosensible de la multiplication virale est due à une de ces protéines et peut-être plus précisément à une protéine enzymatique.

Séance du 20 janvier 1969.

- (1) C. MARTIN et M. GALLET, Comptes rendus, 262, Série D, 1966, p. 646.
- (2) C. MARTIN et M. GALLET, Comptes rendus, 262, Série D, 1966, p. 997.
- (3) C. MARTIN et M. GALLET, Comptes rendus, 263, Série D, 1966, p. 1316.
- (4) R. C. STAPLES et M.A. STAHMANN, Phytopathology, 54, 1964, p.760.
- (5) L. ORNSTEIN, Disc electrophoresis I : Background and theory, Ann. N. Y. Acad. Sc., 121, 1964, p.321-349.
- (6) B.J. DAVIS, Disc electrophoresis II : Method and application to human serum proteins, Ann. N. Y. Acad. Sc., 121, 1964, p. 404-427.

(Station de Physiopathologie Végétale I.N.R.A.,
D.V. n° 1540, 21-Dijon, Côte d'Or.)

PHYTOPATHOLOGIE. — *Température et synthèse de matériel protéique viral chez le Nicotiana Xanthi n. c. infecté par le virus de la Mosaïque du Tabac.*
Note (*) de MM. Silvio Gisinazzi et Jean-Claude Vallée, présentée par M. Lucien Plantefol.

L'étude par électrophorèse des protéines solubles, en fonction de la température, chez le *Nicotiana Xanthi n. c.*, hypersensible au virus de la Mosaïque du Tabac, permet de mettre en évidence l'accumulation de matériel protéique viral chez les plantes malades à 30-32 °C.

L'étude électrophorétique des protéines solubles en fonction de la température chez le *Nicotiana Xanthi n. c.*, hypersensible au virus de la Mosaïque du Tabac (V. M. T.), montre qu'il y a des différences, soit qualitatives, soit quantitatives entre plantes saines et malades à 20 °C et à 30-32 °C ⁽¹⁾. Parmi ces variations, nous avons commencé par étudier celle qui se manifeste au niveau de la bande que nous avons nommée « a » chez une plante malade à 30-32 °C, c'est-à-dire dans les conditions de levée de l'hypersensibilité au V. M. T. [(2), (3), (4)].

Nous avons en effet montré qu'il y a, dans ces conditions une accumulation considérable de la bande « a », 72 h après l'inoculation (fig. 1). Des travaux complémentaires nous ont permis de préciser un certain nombre de faits concernant ce type de protéines. Les méthodes employées sont celles de Staples et Stahmann pour l'extraction des protéines solubles et de Ornstein et Davis pour l'électrophorèse en gel de polyacrylamide ⁽¹⁾.

Des tests sérologiques, réalisés le long du gel contre de l'antisérum viral, n'ont donné une réaction positive qu'au niveau de la bande « a » chez le malade à 30-32 °C (fig. 2) et non à 20 °C. Ceci nous permet de dire que nous nous trouvons, selon la température, devant deux types de protéines ayant les mêmes caractéristiques électrophorétiques, mais de nature différente. L'une est d'origine virale et nous ne la trouvons que dans les tissus malades à 30-32 °C, l'autre d'origine végétale et existant aussi bien chez les témoins sains que chez les malades à 20 °C et à 30-32 °C. La première sera désignée désormais bande A et la deuxième, bande « a ». L'élimination de cette protéine virale, c'est-à-dire de la bande A, par précipitation au $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à 40 % nous permet de mettre en évidence chez la plante malade à 30-32 °C la bande « a » (fig. 1).

COMPORTEMENT DANS LE TEMPS DE LA BANDE A. — Une étude dynamique de l'évolution de la présence de cette bande A nous a montré qu'elle n'apparaît que 48 h après l'inoculation et qu'elle augmente ensuite progressivement pendant au moins 10 jours.

EFFET DE TRANSFERTS THERMIQUES. — Bien qu'à 20 °C la réaction d'hypersensibilité ne s'accompagne pas de l'apparition de la bande A, il est cependant intéressant d'étudier l'effet de transferts thermiques sur la formation de cette protéine virale. Pour cela, des *Nicotiana Xanthi n. c.* sont inoculés à 20 °C et une fois les

lésions locales apparues, c'est-à-dire 72 h après l'inoculation, les plantes sont transférées à 30-32 °C pendant 72 h. La réaction d'hypersensibilité étant levée dans ces conditions, la multiplication du virus reprend et la bande A apparaît à nouveau comme si la plante n'avait séjourné que 72 h à 30-32 °C après l'inoculation. Le transfert inverse de 30-32 °C à 20 °C, que ce soit 48 h, 72 h ou 21 jours après l'inoculation, n'entraîne pas la disparition de la bande A lorsque la réaction nécrotique d'hypersensibilité est redéclenchée.

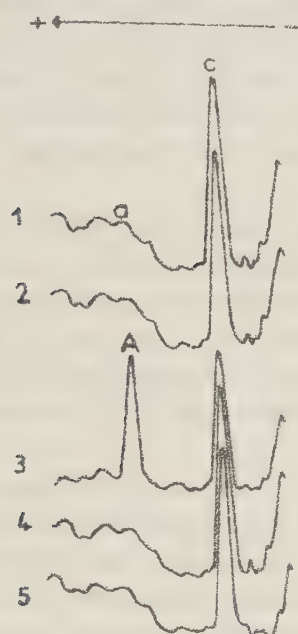


Fig. 1

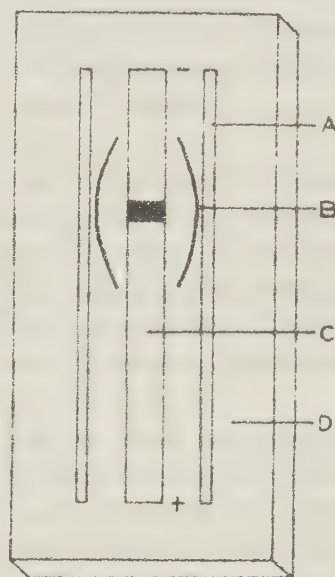


Fig. 2

Fig. 1. — Enregistrement densitométrique, au « Photovolt » de gels de polyacrylamide après séparation électrophorétique d'une solution de protéines solubles de plante : 1. Malade à 20 °C ; 2. Sain à 20 °C ; 3. Malade à 30-32 °C ; 4. Malade à 30-32 °C après élimination du composé protéique viral (bande A) par précipitation au $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à 40 % ; 5. Saine à 30-32 °C.

Fig. 2. — Schéma de l'arc de précipitation, obtenu par immuno-diffusion en gel d'agar contre de l'anti-sérum du VMT, après séparation électrophorétique en gel de polyacrylamide d'une solution de protéines solubles de plante malade à 30-32 °C.

A. Tranchée contenant l'antisérum du VMT ; B. Arc de précipitation ; C. Gel de polyacrylamide ; D. Support en gel d'agar.

ETUDE CHEZ LE *NICOTIANA TABACUM* VARIÉTÉ SAMSUN. — La même étude, faite chez cet hôte sensible au V. M. T., montre que la protéine A est aussi bien synthétisée à 20 °C qu'à 30-32 °C. Il faut toutefois remarquer que, à 20 °C, 7 jours au moins sont nécessaires pour pouvoir déceler un début d'accumulation, tandis que, à 30-32 °C, 48 h suffisent. On note aussi chez cet hôte sensible, une augmentation, dans le temps, de la quantité de cette protéine. Ceci nous permet de dire que l'apparition et la relative augmentation dans le temps de la bande A sont bien caractéristiques de l'hôte sensible ou rendu sensible par passage à 30-32 °C. La température ne ferait rien d'autre qu'accentuer ce phénomène.

LA BANDE A N'EST PAS UN ARTEFACT D'EXTRACTION. — Pour être sûr que cette protéine virale est bien présente dans la plante sous cette forme, et qu'elle n'est pas fabriquée lors de l'extraction à partir de particules entières, on fait subir à une solution de V. M. T., purifiée et débarrassée par ultracentrifugation de toute protéine virale se présentant sous une autre forme que les bâtonnets, le même traitement qu'aux solutions de protéines solubles extraites de la plante : aucune bande A n'a été mise ainsi en évidence par électrophorèse. De plus, le passage en électrophorèse d'un jus brut, obtenu par écrasement rapide d'un tissu foliaire de *Nicotiana Xanthi* n. c. malade à 30-32 °C, révèle la présence de cette bande A. Enfin, comme on sait que, en milieu alcalin (ici pH = 8,0), on favorise la dépolymérisation de la protéine du V. M. T. ⁽⁵⁾, quelques essais ont été faits en milieu plus acide (pH = 6,8). Ceux-ci ont bien confirmé les résultats que nous venons d'exposer.

DISCUSSION. — Grâce aux travaux d'autres auteurs, nous sommes en mesure de préciser un peu plus la nature de la bande A. En effet, les travaux effectués par Mc Carthy ⁽⁶⁾, à partir de virus purifié, sur la protéine A obtenue pour la première fois par Schramm ⁽³⁾, montrent qu'en réalité une telle préparation renferme 6 fractions, dont un constituant majeur présentant les mêmes caractéristiques électrophorétiques que notre bande A. Il s'agirait selon Mc Carthy d'un trimère de la sous-unité protéique du V. M. T.

D'autres auteurs ont montré la présence de protéine virale non polymérisée en bâtonnet dans les plantes atteintes par le V. M. T. Sarkar et Jockush ⁽⁷⁾ ont mis en évidence chez le *Nicotiana tabacum* var. *Samsun* l'accumulation, à 35 °C, de matériel protéique viral. Les résultats ne nous permettent pas de dire s'il s'agit ou non du même composé que la bande A. Takahashi et Ishii ⁽⁸⁾ ont isolé la protéine X de *Nicotiana tabacum* var. *Trelease* : il s'agit, dans ce cas, d'une protéine de taille beaucoup plus grande et visible au microscope électronique, tandis que selon Mc Carthy ⁽⁶⁾ le constituant majeur de la protéine A ne donne aucune image.

Il serait intéressant de voir si l'accumulation *in vivo* de cette protéine virale est un phénomène dû essentiellement aux conditions supra-optimales de température ou bien au fait qu'elle n'est pas polymérisable.

(*) Séance du 7 juillet 1969.

(1) S. GIANINAZZI, J.-C. VALLÉE et C. MARTIN, *Comptes rendus*, 268, Série D, 1969, p. 800.

(2) C. MARTIN et M. GALLET, *Comptes rendus*, 262, Série D, 1966, p. 646.

(3) C. MARTIN et M. GALLET, *Comptes rendus*, 262, Série D, 1966, p. 997.

(4) C. MARTIN et M. GALLET, *Comptes rendus*, 263, Série D, 1966, p. 1316.

(5) G. SCHRAMM, *Naturwissenschaften*, 31, 1943, p. 94.

(6) D. MC CARTHY, *J. Gen. Virol.*, 3, 1968, p. 417.

(7) S. SARKAR et H. JOCKUSH, *Biochim. Biophys. Acta*, 160, 1968, p. 259.

(8) W. N. TAKAHASHI et M. ISHII, *American Journal of Botany*, 40, 1953, p. 85.

(Station de Physiopathologie, I. N. R. A.,
B. V. n° 1540, 21-Dijon, Côte-d'Or.)

C O M P L E M E N T I

-:-:-:-:-

Des travaux effectués à différentes températures 15°C, 20°C et 25°C dans les tissus entourant la nécrose, chez le Nicotiana tabacum var. Xanthi n.c. infecté avec le virus de la mosaïque du tabac (V.M.T.), nous ont permis de mettre en évidence la biosynthèse de "trimère" également lors de la réaction d'hypersensibilité. Il faut toutefois noter que la présence sur l'électrophorégramme de la bande "A" n'a été mise en évidence que lorsque l'infection se déroule à 25°C. La méthode employée est celle de l'immuno-diffusion en gel d'agar contre de l'antisérum du V.M.T., après séparation électrophorétique en gel de polyacrylamide des protéines solubles comme indiqué dans la publication précédente. Néanmoins, nous pensons que cette biosynthèse doit avoir lieu aussi à 15°C et 20°C, mais que notre méthode n'est pas suffisamment sensible pour la détection. Nous savons en effet que, lors de la réaction hypersensible, la multiplication virale est plus faible à 15°C et à 20°C qu'à 25°C (Jockusch 1966). Il est donc tout à fait possible que la concentration en "trimère" ne puisse atteindre aux températures les plus basses le minimum nécessaire pour être détectée avec la méthode immuno-électrophorétique employée. Van Loon et Van Kammen (1970) sont parvenus à des résultats semblables.

Ces résultats obtenus dans les tissus entourant la nécrose sont en accord avec les observations faites au microscope électronique par Martin, Scalla, Meignoz et Gallet (1969). Ces auteurs ont mis en évidence, dans ces mêmes tissus, la présence de particules qui pourraient être des virions incomplets. On peut supposer qu'un blocage de synthèse de la protéine de la capsid empêche la formation de particules virales complètes. Il résulte de ces observations que les mécanismes responsables de l'arrêt de la multiplication virale, dont l'action n'est pas incompatible avec la survie des cellules, doivent être d'autre nature que ceux conduisant à la formation de la nécrose. Pour l'instant, nous savons simplement qu'ils sont thermosensibles (Samuel 1931, Kassanis 1952, Martin et Gallet 1966 a, b et c).

VIROLOGIE. — *Biosynthèse de la capside du virus de la Mosaïque du Tabac chez le Nicotiana Xanthi n. c. à 32 °C.* Note (*) de MM. Silvio Glaninazzi, René Scalla et M^{me} Jacqueline Rigaud, présentée par M. Lucien Plantefol.

L'incorporation *in vivo* de leucine radioactive chez le *Nicotiana Xanthi* n. c. infecté par le virus de la Mosaïque du Tabac à 32 °C montre que les capsomères du virus sont de loin les protéines les plus activement synthétisées.

Au cours de l'infection systémique du *Nicotiana Xanthi* n. c. par le virus de la Mosaïque du Tabac (V. M. T.) à 32 °C, l'étude par électrophorèse des protéines solubles montre la présence de protéine virale libre [(¹), (²)]. Il s'agit probablement d'un ensemble de trois capsomères (trimère), d'après son comportement électrophorétique et d'après les travaux effectués *in vitro* par Mc Carty (³) sur la protéine de la capside virale.

Pour savoir si la présence de la protéine virale sur les électrophorégrammes est le résultat d'une biosynthèse ou d'une dégradation, nous avons procédé à des incorporations de leucine ¹⁴C.

Comme pour nos expériences précédentes, nous avons analysé les protéines du *Nicotiana Xanthi* n. c. lors d'une infection généralisée par le V. M. T. à 32 °C.

Le protocole expérimental est le suivant : on prélève sur des Tabacs placés à 32 °C sous 18 000 lx, des feuilles inoculées depuis trois jours et des feuilles saines témoins ; ces feuilles absorbent alors par leur pétiole de la L-leucine ¹⁴C (2 µCi/ml) pendant 2 h (toujours à 32 °C et sous 18 000 lx). On extrait ensuite protéines et virus à +2 °C, en broyant les tissus au mortier dans un tampon Tris 0,1 M-saccharose 0,5 M-mercaptoéthanol 0,3 %, ajusté à pH 8 avec HCl. Après une clarification du broyat (15 mn à 25 000 g) le virus est séparé des protéines solubles (60 mn à 100 000 g), purifié dans un gradient de saccharose 5-30 % (150 mn à 24 000 tr/mn dans le rotor « Spinco SW 25 ») ; les fractions sont précipitées par l'acide trichloracétique, et leur radioactivité est comptée par scintillation liquide. Le surnageant d'ultracentrifugation est dialysé pendant une nuit, et les protéines solubles qu'il renferme sont séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, selon la méthode de Ornstein (⁴) et Dawis (⁵). Le gel est ensuite découpé en tranches de 1,5 mm d'épaisseur ; chaque fraction est solubilisée par 0,05 ml de H₂O₂ à 30 % pendant une nuit, reprise par 1 ml d'hydroxyde d'hyamine ; on ajoute 10 ml de scintillateur au toluène avant de compter la radioactivité.

RÉSULTATS. — Les enregistrements densitométriques des électrophorèses et des gradients sont représentés sur les figures 1 à 4. L'ensemble des résultats est schématisé ci-après.

Les comptages sont corrigés pour compenser les différences d'absorption de leucine ¹⁴C par les feuilles saines et malades ; les nombres indiqués sur le tableau sont calculés pour des échantillons de 2,5 g de poids frais.

TABLEAU

	Feuille saine cpm	Feuille malade	
		cpm	% des protéines solubles
Protéines solubles totales	196 300	210 800	—
Protéine virale ...	—	73 330	34,7 %
Virus entier	—	13 520	—

On voit que la protéine virale est de loin la plus activement synthétisée chez les feuilles malades ; sa radioactivité y représente environ le tiers de celle des protéines solubles totales. D'autre part, pendant les deux heures de marquage, elle a incorporé une quantité de leucine ^{14}C nettement supérieure à celle que l'on retrouve dans les virions complets.

Enfin, nous avons également obtenu ces résultats chez le *N. tabacum* var. *Samsun* (sensible au V. M. T.) lors d'une infection à 32 °C.

CONCLUSION. — Des résultats que nous venons d'énoncer, on peut tirer des conclusions sur quatre plans :

1. Au moins dans les conditions expérimentales que nous avons choisies, on peut mettre en évidence une biosynthèse très importante des capsomères du V. M. T. La comparaison par électrophorèse des protéines solubles de Tabacs sains et infectés montre au niveau de la protéine virale une incorporation spectaculaire de leucine ^{14}C .

2. Puisque dans une feuille infectée la protéine virale se marque plus fortement en 2 h que les virions entiers, il est probable que cette protéine libre est un précurseur du virus. Nous rejoignons ici le travail effectué par Van Rysselberge et Jeener (6) avec une technique différente.

3. La synthèse protéique (protéines solubles y compris les protéines virales) est augmentée chez les plantes malades, au moins à certains stades de l'infection.

4. Enfin, même lorsque l'infection ne produit, comme ici, que des symptômes légers sur la feuille inoculée, elle peut inhiber partiellement la biosynthèse des protéines cellulaires normales. La traduction des ARN messagers cellulaires est donc

Electrophorèse des protéines solubles. L'échantillon (30 μl) est déposé du côté de la cathode [A, protéine virale (2) ; a, protéine cellulaire (2)].

Fig. 1 : Feuilles saines. — Fig. 2 : Feuilles inoculées.

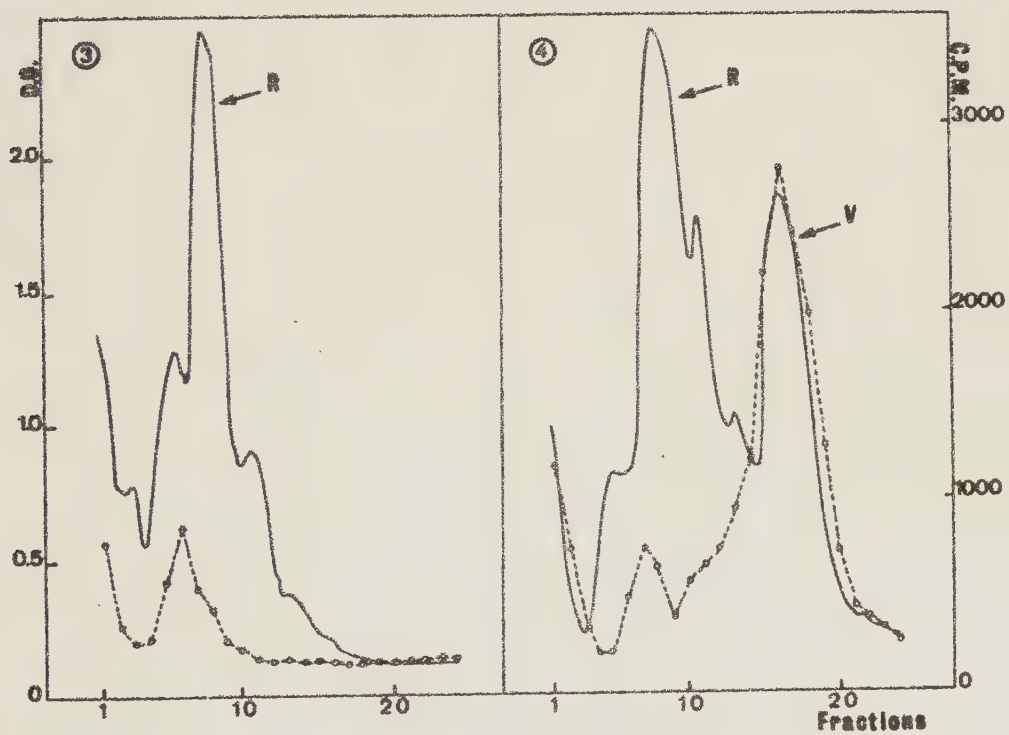
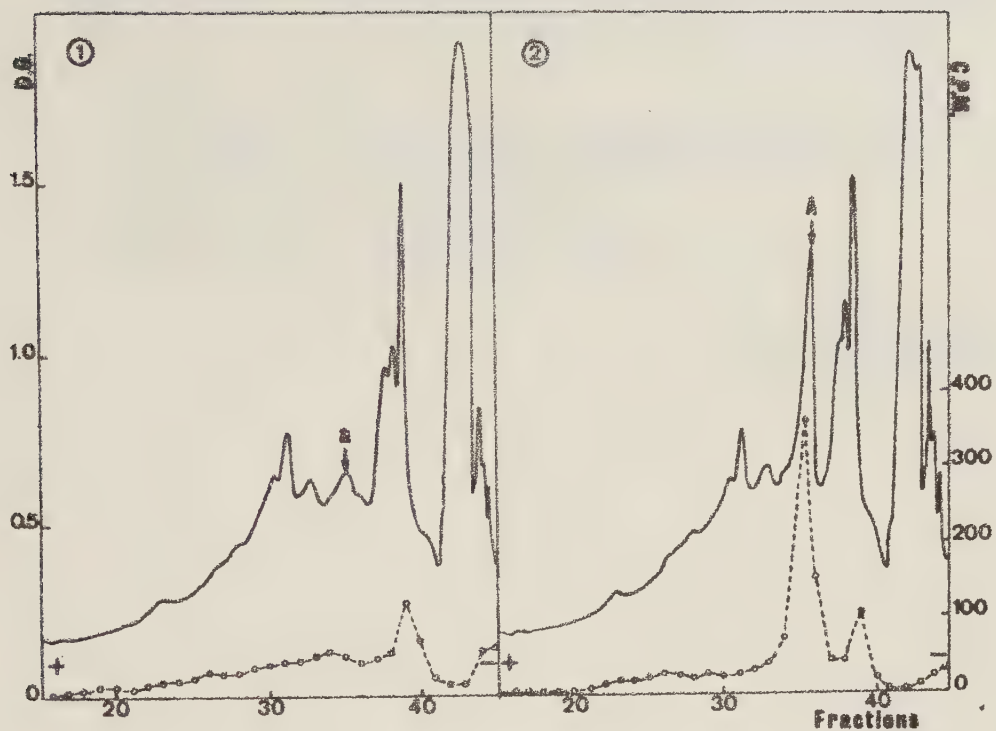
— : Densité optique après coloration par le Noir Amido (Densitomètre Kipp et Zonen, sans filtre) ;
 ○ - - ○ : Radioactivité de chaque fraction.

Analyse en gradient de saccharose (5-30 %) des particules sédimentées à 100 000 g. La fraction 1 correspond au sommet du gradient (R, ribosomes ; V, V. M. T.).

Fig. 3 : Feuilles saines. — Fig. 4 : Feuilles inoculées.

— : Densité optique à 254 m μ (analyseur ISCO) ; ○ - - ○ : Radioactivité de chaque fraction.

(3)



ralentie au profit de l'ARN viral, mais un mécanisme de régulation inconnu limite ce phénomène à un niveau compatible avec la survie des cellules infectées.

(*) Séance du 25 mai 1970.

(1) S. GIANINAZZI, J.-C. VALLÉE et C. MARTIN, *Comptes rendus*, 269, Série D, 1969, p. 800.

(2) S. GIANINAZZI et J.-C. VALLÉE, *Comptes rendus*, 269, Série D, 1969, p. 593.

(3) D. MC CARTHY, *J. Gen. Virol.*, 3, 1968, p. 417.

(4) L. ORNSTEIN, *Ann. N. Y. Acad. Sc.*, 121, 1964, p. 321.

(5) B. J. DAVIS, *Ann. N. Y. Acad. Sc.*, 121, 1964, p. 404.

(6) C. VAN RYSSSELBERGE et R. JEENER, *Biochim. Biophys. Acta*, 23, 1957, p. 18.

(Station de Physiopathologie I. N. R. A.,
B. V. n° 1540, 21-Dijon, Côte-d'Or.)

Ces premiers résultats étant acquis, nous avons abordé l'étude de la synthèse protéique chez le Nicotiana tabacum var. Xanthi au cours de la réaction hypersensible à l'aide de traceurs radioactifs.

Ces travaux ont fait l'objet de l'article (destiné à être publié) qui suit.

ARTICLE DESTINE A ETRE PUBLIE
(PHYSIOLOGIE VEGETALE)

ETUDE DE LA SYNTHÈSE PROTÉIQUE CHEZ

Nicotiana tabacum var. Xanthi n. c.

AU COURS DE LA RÉACTION HYPERSENSIBLE AU VIRUS DE LA MOSAÏQUE DU TABAC

par. R. SCALLA, S. GIANINAZZI et C. MARTIN

Station de Physiopathologie Végétale INRA.

Dijon, France.

Titre abrégé : Protéosynthèse chez un tabac hypersensible.

R E S U M E

Nous avons étudié la synthèse protéique chez un tabac hypersensible (Nicotiana tabacum var. Xanthi n. c.) infecté par le virus de la mosaïque du tabac. Au cours d'une infection généralisée non nécrotique, à 32°C, la protéosynthèse totale a augmenté pendant la phase la plus active de la synthèse virale. L'analyse par électrophorèse des protéines marquées à la leucine radioactive a montré que 30 à 50 pour cent des protéines synthétisées étaient des capsomères viraux libres, et que la synthèse des protéines cellulaires solubles était ralentie. Après déclenchement de la réaction hypersensible par transfert des plantes infectées à une température de 20°, nous avons constaté que la synthèse protéique totale et celle des capsomères viraux étaient inchangées jusqu'à l'apparition des symptômes morphologiques, mais qu'à partir de ce moment, ces synthèses étaient progressivement inhibées.

Nous avons donc constaté qu'une baisse de la protéosynthèse ne se manifeste pas avant l'apparition des symptômes morphologiques. Il est donc probable que cette inhibition est un phénomène secondaire de la réaction nécrotique d'hypersensibilité.

S U M M A R Y

Protein synthesis was studied in a hypersensitive tobacco (Nicotiana tabacum var. Xanthi n. c.) infected by the tobacco mosaic virus. During a systemic non-necrotic infection at 32°, the total protein synthesis was increased while the more active stage of viral synthesis was taking place. Electrophoretic analysis of soluble proteins labelled with radioactive leucine showed that (i) among the proteins synthesized, 30 to 50 per cent were free viral capsomeres, and (ii) the synthesis of soluble cellular proteins was slowed down. After starting the hypersensitive reaction, by exposing the infected plants to a temperature of 20°, the synthesis of soluble cellular proteins and that of viral capsomeres continued unchanged until the morphological symptoms appeared. From then on, these syntheses were progressively slowed down.

Since the inhibition of total protein synthesis did not appear before morphological symptoms, a possible conclusion is that this inhibition is a secondary phenomenon.

INTRODUCTION

Lorsqu'on inocule un virus à une plante qui lui est hypersensible, ce virus se multiplie généralement très peu, mais une partie des cellules infectées sont tuées. Il se forme ainsi sur les feuilles contaminées des lésions locales nécrotiques composées d'une zone centrale de cellules mortes et d'une zone périphérique de cellules infectées mais vivantes, dans lesquelles la multiplication virale est inhibée. Cette réaction d'hypersensibilité pose donc un double problème : par quel moyen la plante résiste-t-elle à l'infection virale ? De quelle manière le virus exerce-t-il son action pathogène ? C'est la deuxième question que nous aborderons dans le présent travail.

Selon une théorie souvent admise, la mort d'une partie des cellules infectées serait due à une oxydation des composés phénoliques en quinones toxiques ; en effet, l'activité de la polyphénoloxydase augmente fortement lorsqu'apparaissent les lésions locales. Cependant, certaines expériences sont en désaccord avec cette interprétation : comme l'a montré Jockusch (1966), si l'on provoque par blessure une hyperactivité de la polyphénoloxydase, l'apparition des lésions locales n'est pas accélérée, mais au contraire retardée ; d'autre part, au moins dans certaines conditions, les symptômes nécrotiques de la réaction hypersensible apparaissent sans que l'activité de la polyphénoloxydase dépasse celle des plantes saines (Cabanne, Scalla et Martin, 1968). Par contre, nous avons pu montrer que l'apparition des nécroses est précédée par une altération du métabolisme du phosphore (Scalla et Meignoz, 1967), en liaison avec un changement de structure des chloroplastes (Scalla et col., 1969).

En fait, il serait souhaitable de pouvoir rattacher à un phénomène primaire unique les nombreuses déviations métaboliques qui accompagnent la réaction hypersensible. Comme ce phénomène primaire devrait nécessairement affecter un processus fondamental du fonctionnement de la cellule, il est tentant de le rechercher au niveau du métabolisme des macromolécules (on sait d'ailleurs que divers bactériophages et virus d'animaux inhibent la biosynthèse des macromolécules chez les cellules qu'ils infectent). Les expériences exposées ci-dessous ont été entreprises pour étudier d'éventuelles altérations de la biosynthèse protéique chez le tabac au cours de la réaction hypersensible au virus de la mosaïque du tabac (VMT).

Habituellement, pour des études de ce genre, on utilise des feuilles à lésions locales maintenues à une température constantz. Malheureusement, sauf lorsqu'on étudie des molécules ou des phénomènes propres au virus, il est difficile de distinguer dans le métabolisme ce qui revient aux cellules infectées ou aux cellules non infectées. On peut tourner la difficulté en prélevant de petits échantillons dans des zones bien précises (Solymosy et Farkas, 1963) ou en étudiant des déviations métaboliques en fonction du nombre de lésions locales (Sunderland et Merrett, 1967). Mais nous avons préféré procéder autrement en profitant d'une particularité des tabacs hypersensibles au virus de la mosaïque du tabac : à une température supérieure à 30°, l'infection est systémique et non nécrotique (Samuel, 1931); les lésions locales nécrotiques n'apparaissent que si la température est inférieure à 30°. En modifiant la température, on passe réversiblement d'un type de réaction à l'autre (Kassanis, 1952 ; Martin et Gallet, 1966 a, b et c). En particulier, on peut provoquer à 32° une multiplication virale abondante, puis déclencher par transfert à 20° une réaction hypersensible localisée dans les tissus où le virus est en train de se multiplier activement. Dans des conditions expérimentales convenables, on obtient des symptômes nécrotiques sur la majeure partie de la feuille inoculée. Enfin, le transfert thermique a l'avantage de déclencher la réaction hypersensible exactement au moment choisi.

Au cours du travail exposé ici, nous avons donc étudié successivement chez le Nicotiana tabacum var. Xanthi n. c. la protéosynthèse au cours d'une infection systémique à 32°, puis au cours de la réaction nécrotique déclenchée par transfert à 20°.

METHODES

Plantes et virus. Les Nicotiana tabacum var. Xanthi n. c. sont cultivés en serre et arrosés périodiquement avec une solution minérale nutritive. Ils sont utilisés à l'âge de 10 semaines environ. Trois jours avant le début des expériences, ils sont placés dans une salle à 20°C, 18.000 lux et 80 % HR. Le VMT (purifié, en solution dans l'eau) est inoculé à l'aide de carborundum sur les deux plus jeunes feuilles entièrement développées. La concentration utilisée (environ 10 µg/ml), est légèrement modifiée en fonction de l'état physiologique des lots de plantes, de manière à obtenir un nombre à peu près constant de sites d'infection par feuille. Aussitôt après l'inoculation, les plantes infectées et

les plantes saines témoins sont transférées à 32°C, 18.000 lux et 30 % HR. Pour déclencher la réaction hypersensible, on replace certaines plantes dans la salle à 20°C.

Dosage du VMT. Il est effectué par la méthode classique de précipitation sérologique en tube (méthode de dilution limite). Les feuilles malades, conservées au congélateur, sont broyées dans du tampon phosphate 0,1 M. pH 7 contenant 0,1 % de bisulfite de sodium. Après une centrifugation à basse vitesse, on prépare à partir des extraits des séries de dilutions que l'on met en présence de sérum anti-VMT. La présence ou l'absence d'un précipité est notée après une incubation de 2 heures à 40°C. plus une nuit à 4°C. On exprime les résultats en mg de VMT par g. de poids sec de tissu végétal, par comparaison avec une solution étalonée de VMT purifié.

Incorporation de leucine ^{14}C dans la fraction protéique totale. Huit rondelles de feuilles de 22 mm de diamètre sont placées en boîte de Pétri sur une solution de L - leucine ^{14}C ($1\mu\text{Ci./ml.}$; 60-130 Ci/mM). L'incorporation a lieu à 20° ou 32° sous 18.000 lux. Au moment voulu, les rondelles de feuilles sont lavées trois fois à l'eau distillée, séchées, puis fixées dans un mélange bouillant méthanol-chloroforme-eau (Bielecki et Young, 1963). On procède ensuite à deux extractions par le même mélange, avec broyage et centrifugation. Par addition de chloroforme et d'eau, les extraits réunis sont séparés en une phase aqueuse contenant la leucine libre et une phase chloroformique où passent les lipides. L'insoluble est traité par 1'HCl 0,2 N (15 min. à 70°) et lavé par 1'alcool à 80% (Stephenson, Thimann et Zemecnik, 1956). Le culot de centrifugation est desséché sous vide avant d'être repris par la soude 0,25 N (10 min. à 60°) pour dissoudre les protéines. La radioactivité des diverses fractions est mesurée au compteur Geiger sur des fractions aliquotes dont l'autoabsorption est négligeable.

Incorporation de leucine ^{14}C dans les protéines solubles et le V.M.T.

Pour une expérience d'incorporation, on utilise généralement deux feuilles détachées qui absorbent la solution de leucine par leur pétiole. A la fin de l'incorporation, on enlève les nervures centrales, et on broie les limbes au mortier dans un tampon Tris-HCl 0,1 M - pH 8,0, saccharose 0,5 M, mercaptoéthanol 0,05 M, à raison de 1 g. de poids frais pour 1 ml. de tampon. Une clarification de 15 Min. à 25.000 g élimine les gros débris, cinq ml. de surnageant sont alors centrifugés à 100.000 g pendant 60 min. : le virus est sédimenté tandis que les protéines solubles demeurent dans le surnageant. Toutes les opérations sont réalisées à 4°

environ.

Pour séparer les protéines solubles, 50 μ l. du surnageant 100.000 g sont analysés par électrophorèse en gel de polyacrylamide à 10 % selon la méthode de Ornstein (1964) et Davis (1964) (tampon de séparation tris-glycine pH 8,3). On colore ensuite les gels au noir amido dans une solution d'acide acétique 7 % (vol./vol.). Après décoloration dans l'acide acétique à 7 %, on effectue les enregistrements de densité optique dans le visible à l'aide du densitomètre Kipp et Zonen.

Le culot de virus est remis en suspension dans 0,5 ml de tampon tris (0,01 M - pH 8,0) - $Mg\ Cl_2$ 0,01 M. Après une clarification à basse vitesse, on dépose la suspension sur un gradient 5 - 30 % (poids/vol.) de saccharose dissout dans le même tampon. On centrifuge 150 min. à 24.000 tr./min. dans un rotor Spinco SW 25.1 ; l'analyse en densité optique est faite à l'analyseur Isco à 254 m μ .

Pour les mesures de radioactivité, les gels d'électrophorèse sont découpés en tranches de 1,5 mm. que l'on hydrolyse à l'eau oxygénée (0,05 ml. ; une nuit à 50°). On reprend chaque fraction par 1 ml. d'hydroxyde d'hyamine, et on ajoute 10 ml. de scintillateur au toluène. Les fractions (1ml) de gradients de saccharose sont additionnées de 0,5 mg. d'ovalbumine et mélangées à un volume égal d'acide trichloracétique à 20 % (poids/vol.). Les précipités sont recueillis sur filtre Whatman GF/A, lavés à l'acide trichloracétique à 5 %, au mélange alcool-éther et à l'éther. Après séchage, les filtres sont immergés dans 5 ml. de scintillateur au toluène. Les comptages de radioactivité sont effectués avec un compteur Packard Tri-Carb.

RESULTATS

Multiplication virale. Martin et Gallet (1966 a) ont montré que la réaction nécrotique d'hypersensibilité ne peut avoir lieu que pendant la phase de multiplication virale. Pour nos expériences, il est donc nécessaire d'utiliser des feuilles où le virus est en train de se multiplier activement. D'autre part, il est intéressant de rechercher le moment où le plus grand nombre possible de cellules synthétisent des virions : la réaction nécrotique affecte alors un maximum de tissus et le virus est en quantité suffisante pour incorporer une

portion significative de la radioactivité absorbée par la feuille. Pour repérer le stade de l'infection qui répond le mieux à ces conditions, nous avons suivi la multiplication virale dans des feuilles de tabac Xanthi n. c. à 32° et à 20°. La fig. 1 montre que la quantité de virus qui se multiplie à 20° n'est pas décelable par la méthode sérologique utilisée. A 32° par contre, la synthèse du virus est abondante et rapide ; elle a lieu principalement entre le 2ème et le 4ème jour après l'inoculation. Des dosages effectués pour comparaison chez un hôte sensible (Nicotiana tabacum var. Samsun) confirment qu'une température de 32° favorise une multiplication virale rapide (voir également Lebeurier et Badre 1963). Il paraît donc avantageux d'utiliser des feuilles de tabac Xanthi n. c. inoculées depuis 3 jours à 32° puisqu'à ce moment la multiplication virale y est active et que ces feuilles contiennent une quantité appréciable de virus. Lorsqu'on transfère les plantes malades à 20°, les feuilles inoculées se dessèchent totalement en 24 heures environ, les tout premiers signes macroscopiques de la nécrose des tissus apparaissant 7-8 heures après le transfert.

Cinétique de l'incorporation de leucine ^{14}C dans des rondelles de feuilles saines.

La fig. 2 montre que chez des rondelles de feuilles placées sur une solution de leucine radioactive, le marquage de la fraction protéique totale est à peu près linéaire pendant au moins 3 heures, en accord avec les résultats de Stephenson et col. (1956). Dans la phase lipidique, on ne trouve que des traces de radioactivité. Le traitement de la fraction insoluble dans le méthanol par 1'HCl 0,2 N à 70° pendant 30 min. libère une faible partie de la radioactivité totale (environ 10 %) ; dans les expériences suivantes, cette opération a été supprimée.

En présence de 0,1 ng/ml de streptomycine, l'incorporation n'est pas sensiblement modifiée. Les résultats ne sont donc pas faussés par la présence de bactéries.

Synthèse protéique totale dans des rondelles de feuilles saines et infectées.

Compte tenu des résultats précédents, nous avons choisi pour la comparaison de la synthèse protéique totale chez les tabacs sains et malades un temps de marquage de 1 heure.

Chez des tabacs Xanthi n. c. inoculés depuis 3 jours à 32°, l'infection systémique active la protéosynthèse totale (Fig.3). Le transfert à 20° de plantes malades ne provoque pas de changement immédiat ; même après 4-5 heures de séjour à 20°, alors que dans les conditions expérimentales utilisées la réaction d'hy-

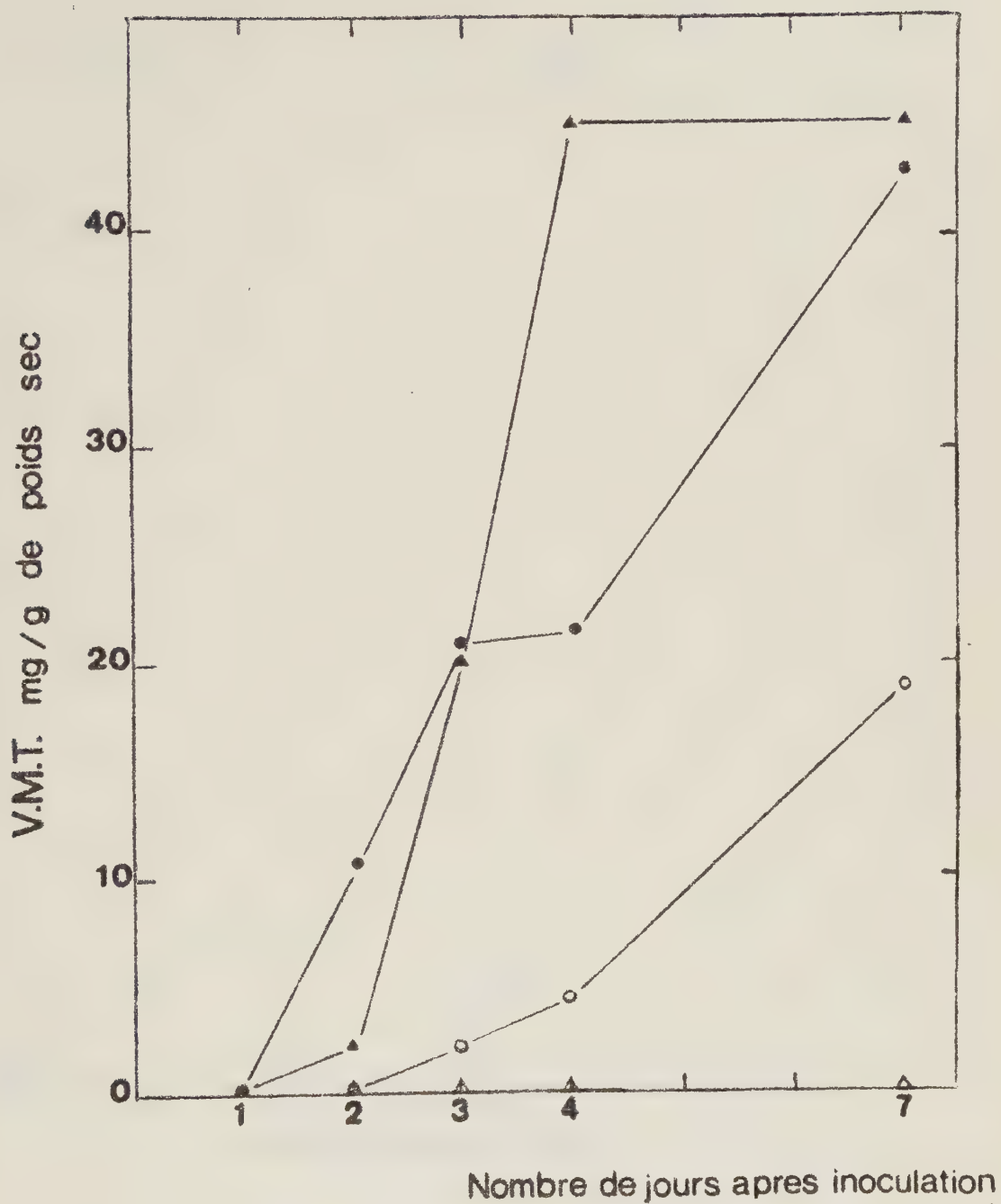


Fig. 1 - Multiplication du V.M.T. dans les feuilles inoculées de *N. tabacum* var. Xanthi n. c. à 20° (Δ—Δ) et à 32° (▲—▲) et de *N. tabacum* var. Samsun à 20° (○—○) et à 32° (●—●).

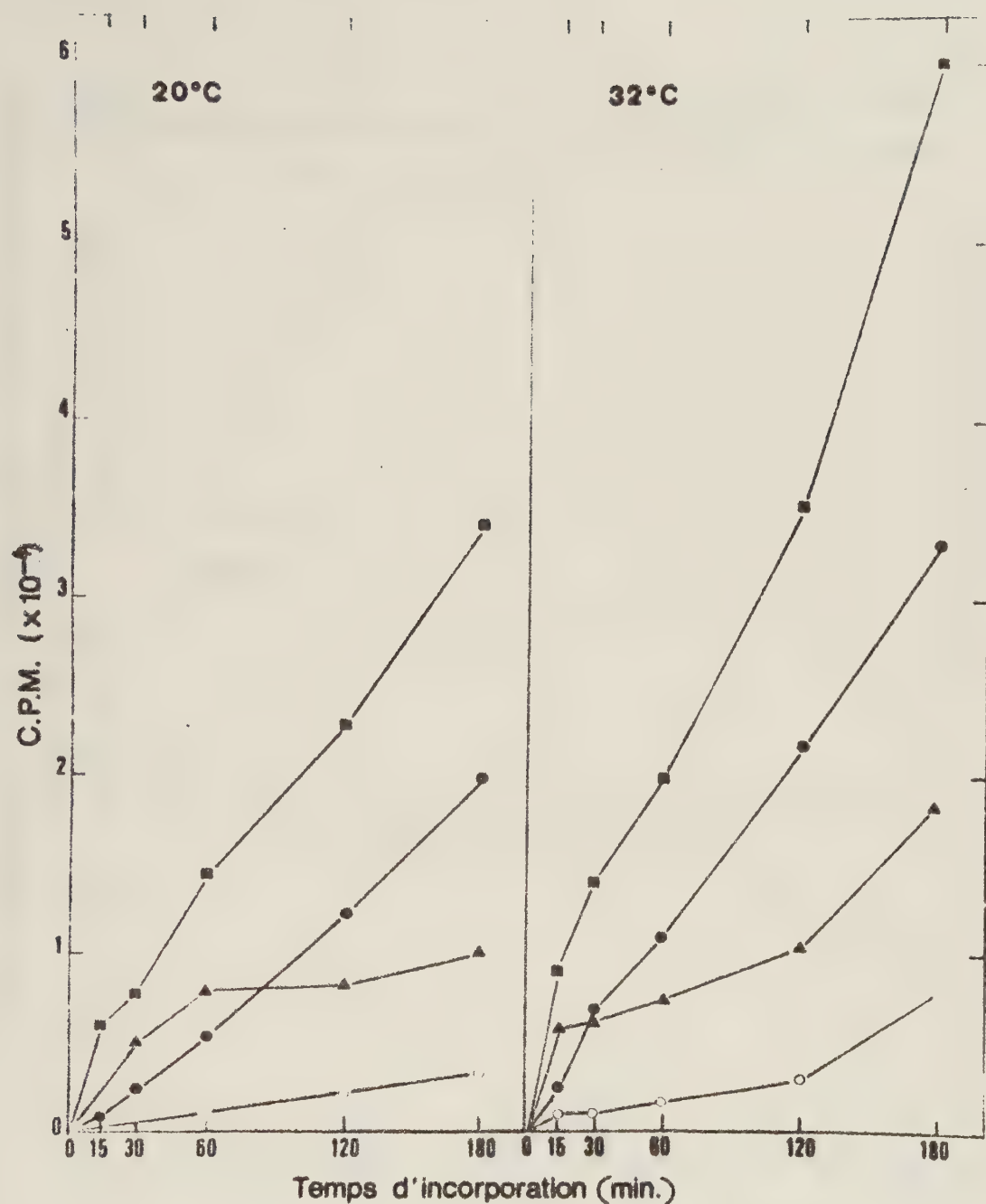


Fig. 2 - Incorporation de leucine ^{14}C ($1\ \mu\text{Ci./ml.}$) par des rondelles de feuilles de *N. tabacum* var. Xanthi n. c. On a mesuré la radioactivité totale (■—■) la radioactivité de la fraction protéique totale (●—●), des petites molécules solubles dans l'eau (▲—▲), et de l'extrait HCl-alcool (○—○). Le marquage des lipides est négligeable.

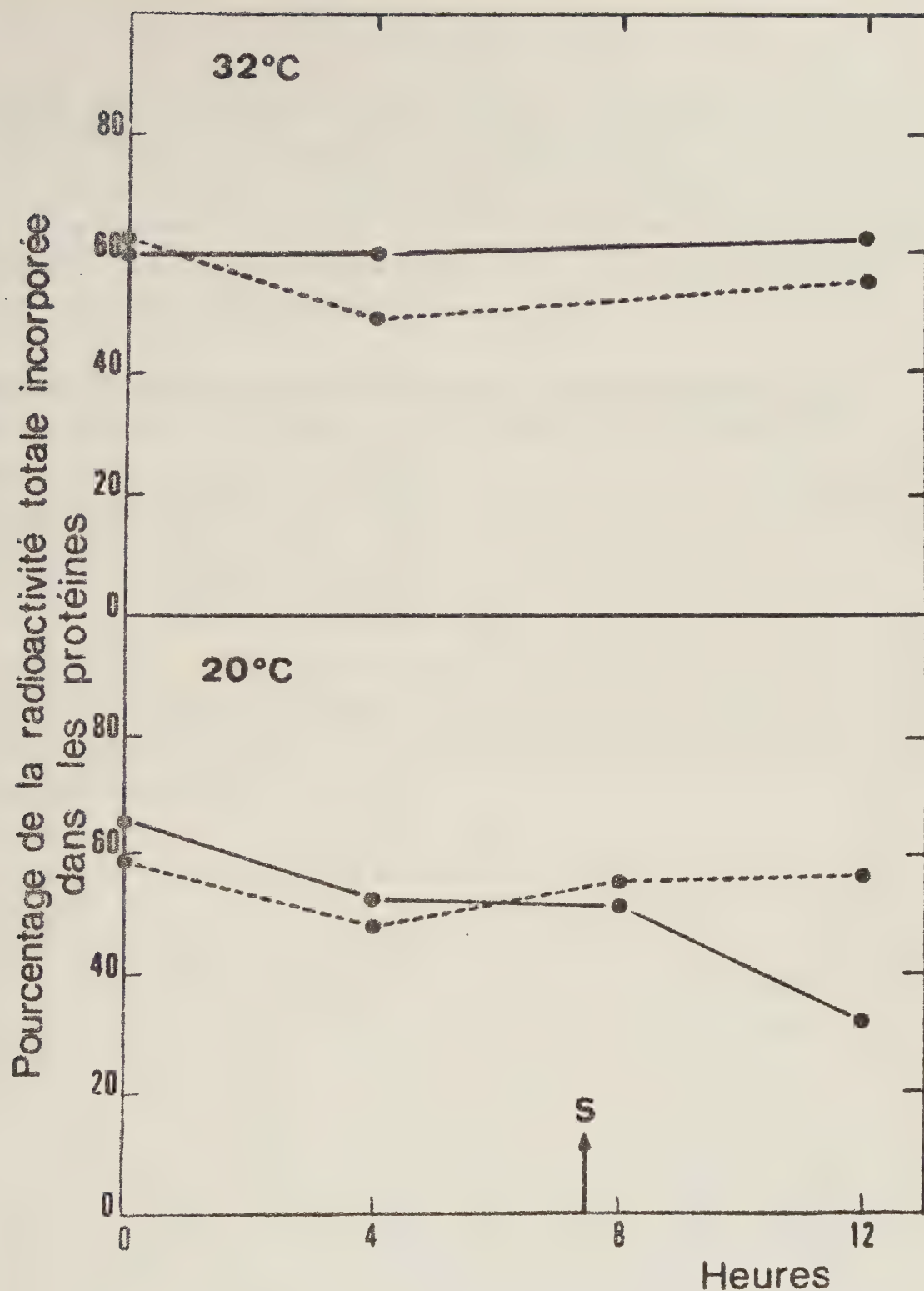


Fig. 3 - Incorporation de leucine ^{14}C dans la fraction protéique totale de feuilles saines (●---●) et inoculées (●—●) de *N. tabacum* var. Xanthi n. c. L'expérience débute après trois jours d'infection par le V.M.T. à 32°C. Les plantes saines et malades sont laissées à 32° ou transférées à 20° au temps zéro. Les incorporations durent une heure (de 0 à 1 heure ; 4 à 5 ; 8 à 9 ; 12 à 13). Les symptômes apparaissent après 7H30 de séjour à 20° (flèche) sous forme de très fines nécroses qui s'agrandissent ensuite.

persensibilité est déclenchée irréversiblement (voir Martin et Gallet, 1966 b), la synthèse protéique se poursuit à une vitesse inchangée. Mais à partir du moment où apparaissent les symptômes nécrotiques, le marquage des protéines diminue progressivement dans les tissus infectés ; 12 heures après le changement de température, les feuilles malades sont flétries et synthétisent nettement moins de protéines que les témoins sains.

Synthèse des protéines cellulaires solubles et des capsomères viraux.

Ces biosynthèses ont été étudiées sur des feuilles saines témoins et des feuilles inoculées depuis 3 jours, d'une part à 32° et d'autre part après déclenchement de la réaction nécrotique par transfert à 20°. Après une absorption pétioleaire de leucine ^{14}C pendant 2 heures, les protéines ont été séparées par électrophorèse et le virus purifié en gradient de densité.

Comme nous l'avons précédemment signalé (Gianinazzi et Vallée, 1969) on peut mettre facilement en évidence les capsomères viraux libres par électrophorèse des protéines solubles des plantes malades, à condition que la synthèse virale soit importante.

Ces capsomères, qui sont probablement à l'état de trimères, forment une bande très nette sur les électrophorégrammes (fig. 4 c et d, 5 c et d) et ils incorporent beaucoup plus rapidement la leucine marquée que les protéines cellulaires. La mesure de la radioactivité des fractions d'électrophorèse montre que dans les feuilles inoculées depuis 3 jours à 32°, le tiers environ des protéines solubles synthétisées sont des protéines virales (35 - 53 %).

Ces capsomères libres sont, en principe, des produits intermédiaires de la fabrication des virions complets. Cependant, ils pourraient également provenir d'une dégradation du virus, provoquée par exemple par le procédé d'extraction des protéines. Nous avons donc effectué une étude cinétique du marquage des capsomères libres et des virions entiers : des feuilles inoculées depuis 3 jours et des feuilles saines témoins ont absorbé à 32° et à la lumière de la leucine ^{14}C pendant 1 heure, puis de la leucine non marquée ($0,75 \cdot 10^{-3}\text{M}$) également pendant 1 heure, enfin de l'eau distillée pendant des temps variables. La fig. 6 a montre que le pourcentage de radioactivité incorporé dans les protéines solubles est plus important dans les feuilles malades que dans les feuilles saines. En ce qui concerne la protéine virale, on voit (fig. 6 b) que le marquage

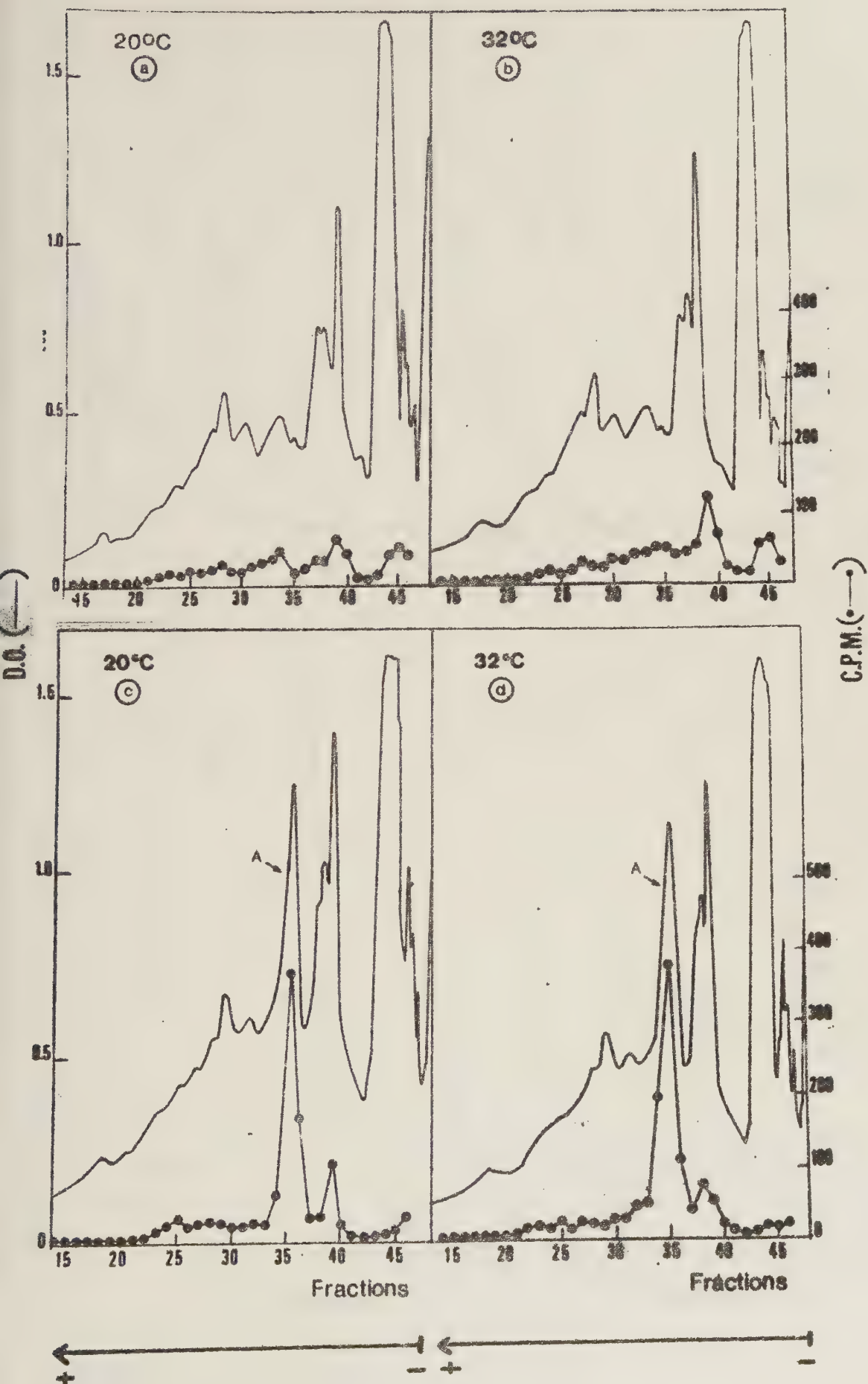


Fig. 4

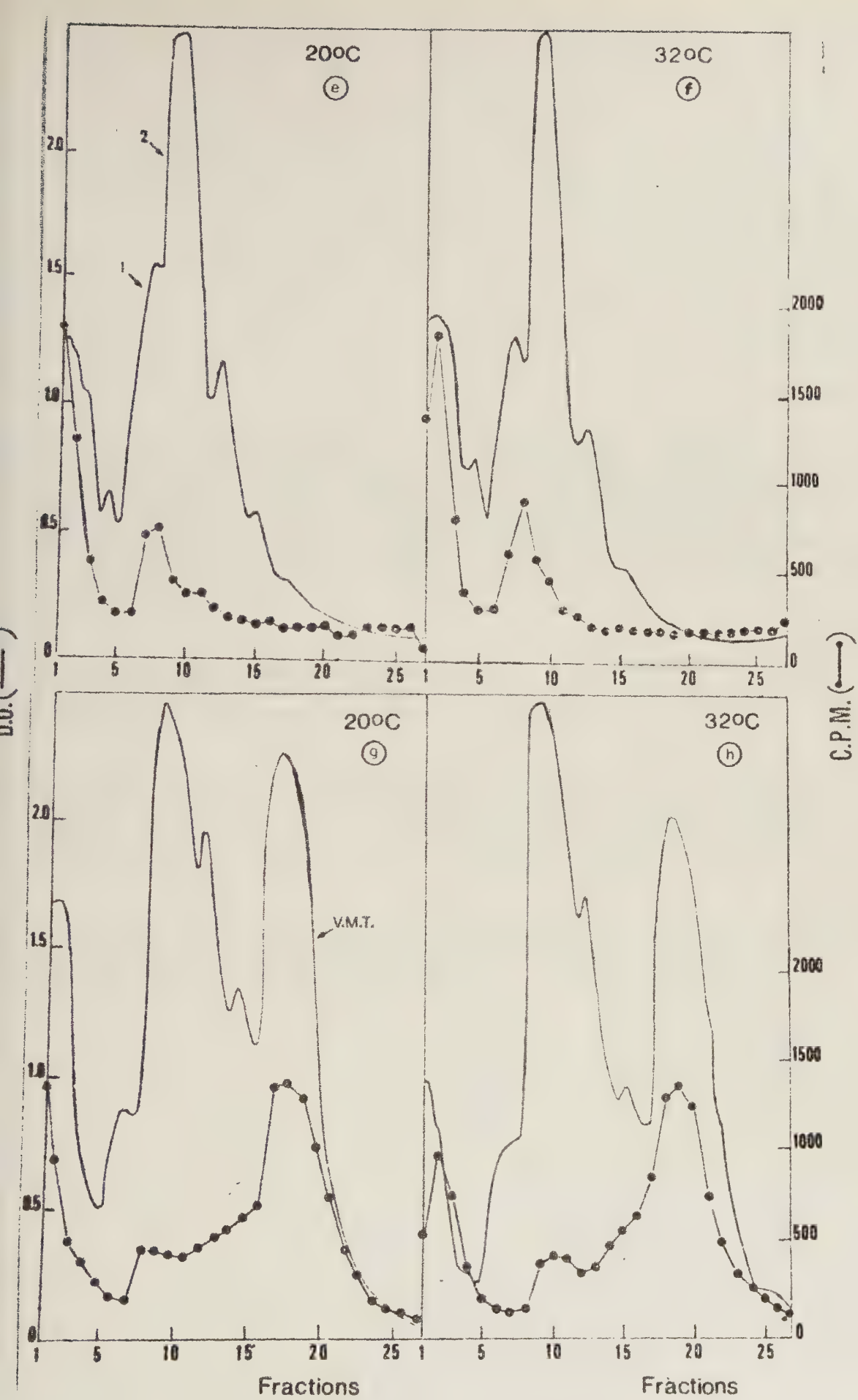


Fig. 4

Fig.4 - Incorporation de leucine ^{14}C dans les protéines solubles et les virions. Aussitôt après l'inoculation, les plantes malades ainsi que les plantes saines témoins sont placées à 32° . Après 3 jours à 32° + 8 heures à 32° ou à 20° , des feuilles détachées incorporent de la leucine marquée ($2\mu\text{Ci./ml}$) pendant 2 heures. A 20° , les symptômes nécrotiques sur les feuilles inoculées apparaissent juste avant l'incorporation de leucine.

- Electrophorèse des protéines solubles : a, b : feuilles saines ; c, d : feuilles inoculées. A désigne la bande des capsomères viraux. L'échantillon est déposé du côté de la cathode.

- Analyse du culot 100.000 g en gradient de densité. e, f : feuilles saines ; g, h : feuilles malades. Les pics 1 et 2 sont probablement les ribosomes 70 s et 80 s, par comparaison avec les données de Hirai et Wildman (1967). La fraction 1 correspond au sommet du tube.

- Tous les chiffres de radioactivité sont corrigés sur une base commune pour compenser les différences d'absorption par les diverses feuilles. Les cpm. réellement comptés sont égaux ou supérieurs à ceux indiqués sur les figures.

es capsomères libres diminue légèrement pendant que celui du virus augmente. En fait, les capsomères libres et les virions entiers sont contaminés par des constituants cellulaires ; on peut opérer une correction approximative de leur radioactivité en retranchant celle que l'on trouve pour les fractions équivalentes des témoins sains. On constate alors que pour 2,5 g de poids frais de feuilles, la radioactivité des virions entiers passe de 10.000 cpm. (1 heure) à 155.250 cpm. (24 heures) alors que celle des capsomères baisse de 194.400 cpm. à 95.500 cpm. La radioactivité gagnée par les virions entiers est donc supérieure à celle perdue par les capsomères libres, car l'incorporation de leucine marquée dans les protéines continue progressivement jusqu'à la fin de l'expérience (fig. 6a) ; il y a donc entre la 1ère et la 24ème heure une intégration supplémentaire de leucine ^{14}C dans le stock de capsomères libres et la synthèse de capsomères compense partiellement leur incorporation dans des virions entiers. Malgré cette imperfection de l'expérience, on peut raisonnablement en déduire que les capsomères libres sont utilisés pour la biosynthèse des virions.

Quant à l'effet de l'infection virale systémique sur les protéines cellulaires, l'examen des électrophorégrammes en densité optique ou en radioactivité nous a montré aucune différence qualitative importante. Il apparaît simplement que la synthèse des protéines cellulaires diminue de 20 à 40 % dans les feuilles qui subissent une infection systémique (voir par exemple les fig. 4 b/d et 5 b/d). Mais, comme la synthèse de protéine virale est très intense, la protéosynthèse totale est plus importante chez les feuilles malades que chez les feuilles saines.

Nous avons remarqué que certains lots de plantes donnent un diagramme d'électrophorèse particulier, dû à une séparation différente de protéines situées entre les fractions 35 et 43. Cette différence, que l'on trouve entre les fig. 4 et 5, n'a pas de relation avec l'infection virale (il s'agit peut-être de variations saisonnières).

Nous avons ensuite étudié l'influence d'un transfert à 20° sur la synthèse des protéines cellulaires et virale. Cette recherche a été effectuée après une infection préalable de 3 jours à 32° suivie d'un séjour de 2 à 14 heures à 20°, c'est-à-dire avant, pendant et après l'apparition des symptômes de la réaction hypersensible. L'apparition des nécroses ne semble pas avoir de relation avec un changement de la vitesse de biosynthèse de la capside virale : les expériences

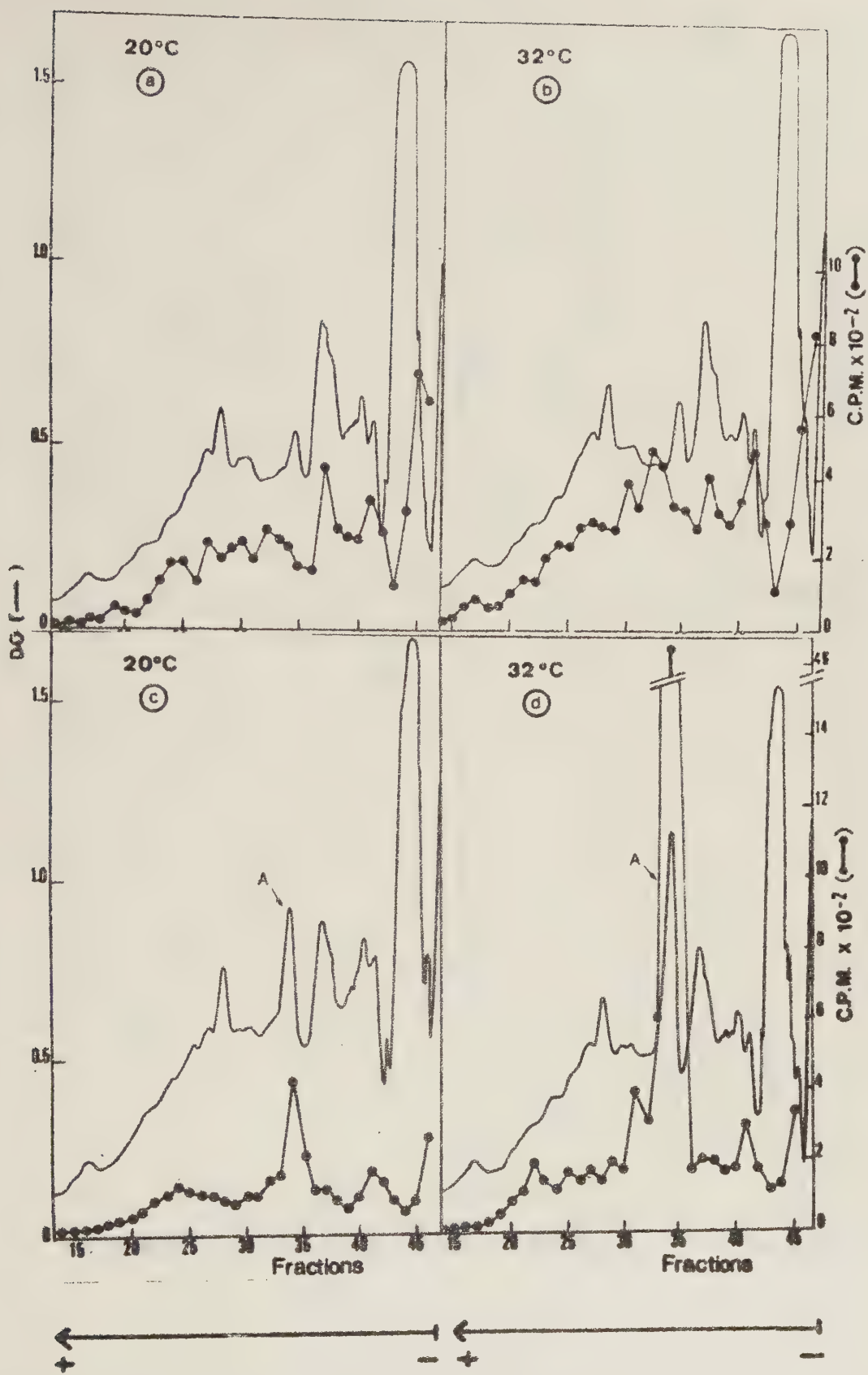


Fig. 5

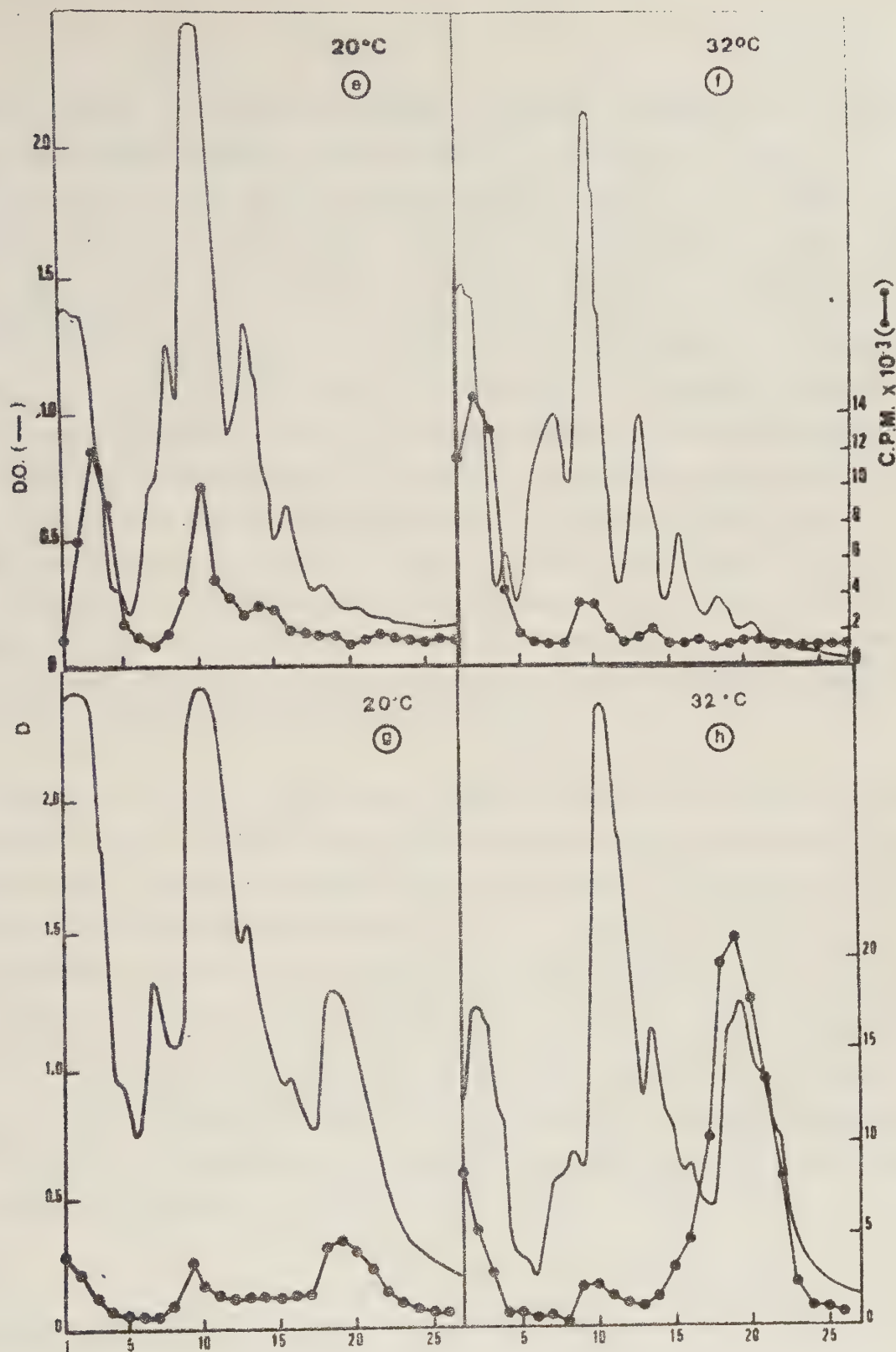


Fig. 5 - Incorporation de leucine ¹⁴C dans les protéines solubles et les virions. Même légende que pour la fig. 4, mais les plantes ont séjourné 3 jours à 32° + 12 heures à 32° ou à 20°, suivis de 2 heures d'incorporation de leucine ¹⁴C (10 μ Ci./ml). Sur les feuilles infectées, les symptômes de nécrose à 20° sont apparus environ 4 heures avant le début de l'incorporation de leucine.

montrent que, depuis le transfert thermique et jusqu'à 2 heures après l'apparition des tout premiers symptômes, la synthèse de la capside virale est inchangée par rapport aux feuilles malades témoins laissées à 32°, aussi bien pour les capsomères libres séparés par électrophorèse que pour les virions complets purifiés en gradient de densité (fig. 4). Ce n'est que de 12 à 14 heures après le transfert de 32° à 20°, soit 4 à 6 heures après le début de la réaction nécrotique qu'on met en évidence une nette inhibition de la synthèse de la capside virale (fig. 5). En variant le moment de l'expérience, on constate que cette inhibition est plus marquée pour les capsomères libres que pour les capsomères assemblés dans des virions entiers. La quantité de capsomères libres finit d'ailleurs par diminuer sur les électrophorégrammes des plantes malades (fig. 5 c et d). L'arrêt de fabrication de capside virale est très probablement dû au mécanisme de résistance de l'hôte hypersensible car nous avons eu soin d'utiliser dans certaines de nos expériences des feuilles malades dont les zones en voie de nécrose étaient séparées par des zones vertes non encore atteintes dans lesquelles le virus pouvait éventuellement se multiplier.

D'autre part, nous n'avons jamais décelé de modification significative dans le profil optique des protéines cellulaires à la suite du transfert thermique ; nous avons simplement constaté que leur marquage diminue uniformément à partir de l'apparition des symptômes (fig. 5 c). Après le transfert à 20° des plantes inoculées, le marquage des protéines solubles diminue en même temps que celui des protéines totales ; l'inhibition de synthèse intéresse donc également les protéines solubles et les protéines insolubles. D'autre part, l'analyse des protéines solubles montre que le pourcentage de radioactivité incorporé par les capsomères viraux ne varie pas, même lorsque la synthèse protéique est descendue à un taux très bas ; l'inhibition de protéosynthèse n'est donc pas spécifique d'une catégorie de protéines.

DISCUSSION ET CONCLUSION

D'un point de vue technique, le système Xanthi n. c.-VMT à 32° permet d'étudier d'une manière presque sélective le marquage des capsomères viraux. Il suffit pour cela de travailler sur des tissus en bon état physiologique où le VMT se multiplie très activement (en particulier grâce à la température d'incubation élevée). Dans ces conditions la protéine virale est de loin celle qui

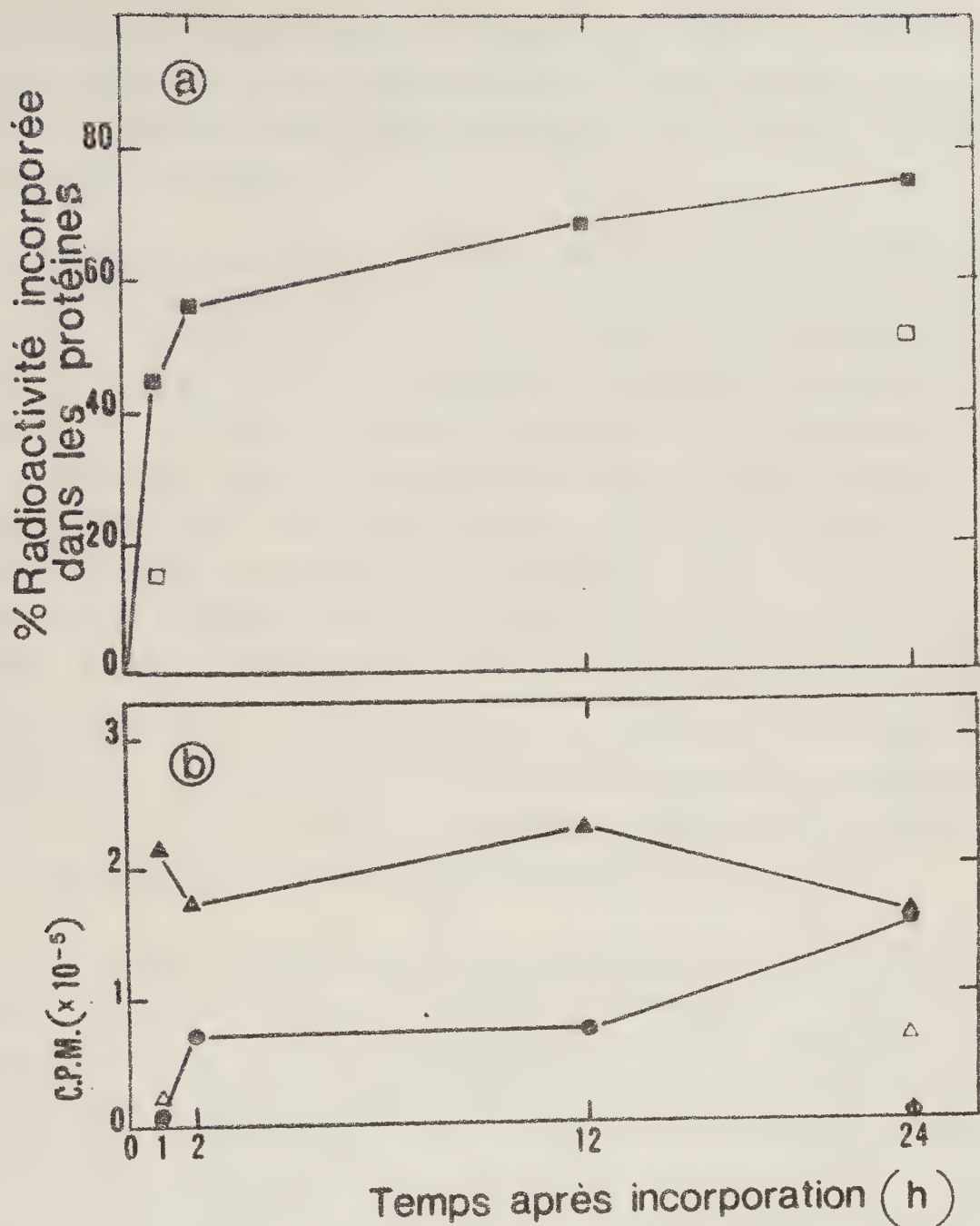


Fig. 6 - Feuilles de Xanthi n. c. saines et inoculées depuis 3 jours à 32°. Absorption de leucine ¹⁴C de 0 à 1 heure, de leucine froide de 1 à 2 H, et d'eau distillée jusqu'à 12 ou 24 heures.

a : incorporation de leucine ¹⁴C dans les protéines solubles totales □ feuilles saines ; ■ — ■ feuilles inoculées.

b : incorporation de leucine ¹⁴C dans les protéines virales libres ▲ — ▲ et la fraction protéique correspondante sur les électrophorèses des plantes saines △ — △ ; dans les virions entiers ● — ● et la fraction correspondante des gradients de densité de plantes saines ○ — ○

incorpore le plus de leucine marquée, et donne dans les gels d'électrophorèse le pic de radioactivité de loin le plus remarquable ; c'est pourquoi nous nous sommes contentés d'analyser d'une manière assez sommaire la radioactivité des protéines cellulaires normales.

Nous avons donc pu étudier en fonction du temps l'incorporation de leucine dans les capsomères libres et les virions entiers. L'exécution de l'expérience est toutefois contrariée par deux obstacles majeurs : l'impossibilité de déclencher et d'arrêter instantanément l'absorption du précurseur radioactif dans toute une feuille, ce qui diminue la précision du marquage, et la protéolyse qui se déclare plus ou moins vite dans les feuilles détachées, ce qui complique l'interprétation des résultats. Malgré tout, l'allure des courbes de marquage que nous avons obtenus semble bien montrer que les capsomères libres sont destinés à s'incorporer dans les bâtonnets viraux. Van Rysselberge et Jeener (1957) étaient d'ailleurs parvenus à une conclusion identique en séparant par une méthode sérologique les protéines cellulaires et la protéine virale. Il est curieux cependant qu'un marquage de longue durée à la leucine soit nécessaire ; sans doute les capsomères, étant en grande quantité à 32°, ont un turn-over relativement lent ; il devrait être possible d'accélérer l'expérience en bloquant la synthèse protéique après absorption de l'acide aminé radioactif.

Si on analyse maintenant les conséquences de l'infection virale sur le métabolisme protéique de l'hôte, on constate que dans les cas d'infection systémique que nous avons étudiés, la protéosynthèse totale est augmentée de 10 à 30 % en général par rapport aux feuilles saines ; Diringer, Anderer et Schramm (1967) ont obtenu des résultats du même ordre. L'étude des électrophorégrammes montre que la radioactivité des capsomères viraux libres représente 30-50 % de la radioactivité incorporée dans les protéines solubles totales. Quant aux protéines cellulaires normales, leur synthèse est diminuée de 30 % en moyenne ; sur ce dernier point nous sommes en désaccord avec Diringer et col. qui n'ont décelé aucune diminution de la synthèse des protéines cellulaires. Au total, la synthèse globale des protéines solubles chez les plantes malades est donc plus importante que chez les plantes saines, en dépit d'une inhibition partielle des protéines cellulaires normales, au moins dans les conditions expérimentales utilisées ici.

Quand on transforme par un changement de température

l'infection systémique en infection hypersensible, la protéosynthèse n'est affectée qu'assez tardivement : elle diminue lorsque les symptômes nécrotiques commencent à apparaître sur les tissus infectés. Comme cette diminution de protéosynthèse ne précède pas les symptômes morphologiques, elle ne paraît pas jouer un rôle primordial dans la mort des cellules infectées. D'autre part, nous l'avons vu, il semble que la synthèse de toutes les catégories de protéines soit affectée en même temps par la réaction hypersensible, et donc que le métabolisme protéique soit arrêté dans son ensemble. On ne peut cependant pas écarter la possibilité que la synthèse ou l'activité d'une ou plusieurs protéines cellulaires soit modifiée sélectivement à un stade précoce de la réaction hypersensible.

Parmi les infections virales, on connaît de nombreux cas d'inhibition de la protéosynthèse, aussi bien avec les phages à ADN ou ARN qu'avec des virus d'animaux (virus de la Vaccine, picornavirus, myxovirus), et on pourrait expliquer ainsi l'action pathogène de ces virus. Cependant, de nombreuses infections lytiques ne provoquent aucune inhibition de la synthèse d'ARN ou de protéines (Plagemann et Swim, 1966). Dans le cas du tabac Xanthi n. c. inoculé avec le VMT, nos expériences montrent qu'une inhibition partielle de la synthèse protéique est compatible avec la survie des cellules infectées (au cours d'une infection systémique) ; par contre, le déclenchement irréversible de la réaction nécrotique ne donne lieu à aucun changement important et immédiat dans la synthèse des protéines. Il ne semble donc pas que la cause de la réaction nécrotique ait un rapport avec une perturbation générale du métabolisme protéique. Enfin, nos expériences montrent que la répression de la synthèse de la capside virale est assez longue à se déclencher : la synthèse protéique virale paraît se dérouler au début de la réaction d'hypersensibilité comme au cours d'une infection systémique ; ce n'est que quelques heures après l'apparition des nécroses que s'installe, sur le pourtour des lésions locales, le mécanisme répressif qui empêche l'ARN viral de jouer son rôle de messenger. Des expériences de plus longue durée seraient donc nécessaires pour mettre en évidence les protéines produites par la plante pendant la répression de la synthèse virale (Gianinazzi, Vallée et Martin, 1969 ; Gianinazzi, Martin et Vallée 1970 ; Van Loon et Van Kammen, 1970).

Les auteurs remercient Madame J. Rigaud pour son excellente collaboration technique et pour la préparation des figures.

R E F E R E N C E S

- BIELESKI, R.L. & YOUNG R.E. (1963). Extraction and separation of phosphate esters from plant tissues. Analytical Biochemistry 6, 154.
- CABANNE, F., SCALLA, R. & MARTIN, C. (1963). Activité de la polyphénoloxydase au cours de la réaction d'hypersensibilité chez Nicotiana Xanthi n. c. infecté par le virus de la mosaïque du tabac. Annales de Physiologie Végétale 10, 199.
- DAVIS, B.J. (1964). Disc electrophoresis - II - Method and application to human serum proteins. Annals of New York Academy of Sciences 121, 404.
- DIRINGER, H., ANDERER, F.A. & SCHRAM, G. (1967). Wachstumsgeschwindigkeit der Peptidkette im Tabakmosaikvirus. Zeitschrift für Naturforschung 22 B, 1280.
- GIANINAZZI, S. & VALLEE, J.C. (1969). Température et synthèse de matériel protéique viral chez Nicotiana Xanthi n. c. infecté par le virus de la mosaïque du Tabac. Comptes rendus hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences, Paris 269, série D, 593.
- GIANINAZZI, S., MARTIN, C. & VALLEE, J.C. (1970). Hypersensibilité aux virus, température et protéines solubles chez le Nicotiana Xanthi n. c. Apparition de nouvelles macromolécules lors de la répression de la synthèse virale. Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des Sciences. Paris 270, série D, 2383.
- GIANINAZZI, S., VALLEE, J.C. & MARTIN, C. (1969). Hypersensibilité aux virus, température et protéines solubles chez le Nicotiana Xanthi n. c. Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des Sciences Paris 268, série D, 800.
- HIRAI, A. & WILDMAN, S.G. (1967). Intracellular site of assembly to TMV-RNA and protein. Virology 33, 467.
- JOCKUSH, H. (1966). The role of host genes, temperature and polyphenoloxydase in the necrotization of TMV infected tobacco tissue. Phytopathologische Zeitschrift 55, 185.
- KASSANIS, B. (1952). Some effects of high temperature on the susceptibility of plant to infection with viruses. Annals of Applied Biology 39, 358.
- LEBEURIER, G. & BADRE, M.L. (1963). Effets de diverses températures sur la cinétique du développement du virus de la mosaïque du tabac. Comptes-rendus

hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences, Paris 257, groupe 13, 2559.

MARTIN, C. & GALLET, M. (1966 a). Contribution à l'étude de l'action de la température sur la réaction d'hypersensibilité de certains hôtes à l'égard du virus de la mosaïque du tabac. Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des Sciences, Paris 262, série D, 646.

MARTIN, C. & GALLET, M. (1966 b). Hypersensibilité aux virus, température et induction florale chez les végétaux. Comptes-rendus hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences 262, série D, 997.

MARTIN, C. & GALLET, M. (1966 c). Nouvelles observations sur le phénomène d'hypersensibilité aux virus chez les végétaux. Comptes-rendus hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences, Paris 263, série D, 1316.

ORNSTEIN, L. (1964). Disc electrophoresis - I : Background and theory - Annals of the New York Academy of sciences 121, 321.

PLAGEMANN, P.G. & SWIM, H.E. (1966). Replication of Mengo virus. I. Effect on synthesis of macromolecules by host cell. Journal of Bacteriology 91, 2317.

SAMUEL, G. (1931). Some experiments on inoculating methods with plant viruses and local lesions. Annals of Applied Biology 18, 494.

SCALLA, R. & MEIGNOZ, R. (1967). Quelques effets d'une infection par le virus de la mosaïque du tabac sur le métabolisme du phosphore chez Nicotiana Xanthi n. c. Annales de Physiologie Végétale 9, 383.

SCALLA, R., MEIGNOZ, R., NOIROT-TIMOTHEE, C. & MARTIN, C. (1969). Etude au microscope électronique des premiers stades des altérations des chloroplastes chez le Nicotiana Xanthi n. c. au cours de la réaction hypersensible au virus de la mosaïque du tabac. Comptes-rendus hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences, Paris 268, série D, 527.

SOLYMOSY, F. & FARKAS, G.L. (1963). Metabolic Characteristics at the Enzymatic Level of Tobacco Tissues Exhibiting Localized Acquired Resistance to Viral Infection. Virology 21, 210.

STEPHENSON, H.L., THIMANN, K.V. & ZAMECNIK, P.C. (1956). Incorporation of C¹⁴-amino acids into proteins of leaf disks and cell-free fractions of tobacco leaves. Archives of biochemistry and biophysics 65, 194.

SUNDERLAND, D.W. & MERRETT, M.J. (1967). Respiration rate, adenosine diphosphate and triphosphate concentration of leaves showing necrotic local lesions following infection by tobacco mosaic virus. Physiologia Plantarum 20, 368.

VAN LOON, L.C. & VAN KAMMEN, A. (1970). Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. "Samsun" and "Samsun NN". Virology 40, 199.

VAN RYSELBERGE, C. & JEENER, R. (1957). Plant virus synthesis and the abnormal protein constituents of infected leaves. Biochimica et Biophysica Acta 23, 18.

Comme nous l'avons montré dans notre première note, il apparaît sur l'électrophorégramme des protéines solubles de Nicotiana tabacum var. Xanthi n.c., lors de la réaction hypersensible, une nouvelle bande que nous avons nommée "b".

Les recherches entreprises sur cet aspect du problème ont fait l'objet de la note et de l'article (destiné à être publié) qui suivent.

VIROLOGIE. — *Hypersensibilité aux virus, température et protéines solubles chez le Nicotiana Xanthi n. c. Apparition de nouvelles macromolécules lors de la répression de la synthèse virale.* Note (*) de MM. Silvio Gianinazzi, Claude Martin et Jean-Claude Vallée, présentée par M. Lucien Plantefol.

L'étude par électrophorèse des protéines solubles chez le *Nicotiana Xanthi* n. c. montre, lors de l'arrêt de la synthèse virale, l'apparition sur l'électrophorégramme de nouvelles bandes qui semblent spécifiques de l'infection virale.

Une publication récente ⁽¹⁾ nous oblige à rédiger plus hâtivement que nous le souhaitons les résultats de nos travaux. En effet, l'étude électrophorétique des protéines solubles en fonction de la température chez le *Nicotiana Xanthi* n. c., hypersensible au virus de la Mosaïque du Tabac (V. M. T.), nous avait déjà montré qu'il y a des différences, soit qualitatives, soit quantitatives entre plantes saines et malades à 20 °C et à 32 °C ⁽²⁾. Parmi ces variations, nous avons montré que celle qui se manifeste au niveau de la bande que nous avons nommée « a » chez une plante malade à 32 °C, c'est-à-dire dans les conditions de synthèse active de V. M. T. après levée de l'hypersensibilité ^[(4), (5), (6)], est constituée de protéine virale libre (bande A), probablement sous forme de trimère ⁽³⁾.

Au cours de ces premières études, nous avons également constaté que lors de la réaction d'hypersensibilité chez le *Nicotiana Xanthi* n. c. à 20 °C, il apparaissait, 72 h après l'infection par le V. M. T., une nouvelle bande (bande b) ⁽²⁾ dans les feuilles présentant des lésions locales. Des travaux complémentaires réalisés à 15 °C et à 20 °C avec des techniques plus fines nous ont permis de montrer qu'il s'agit au moins de huit bandes bien différenciées (fig. 1 a, b et 2 a, b).

Ces macromolécules progressivement détectables à partir de 50 h après l'infection (c'est-à-dire environ 14 h après l'apparition des symptômes nécrotiques), sont nettement visibles sur l'électrophorégramme entre 72 et 96 h selon le nombre de lésions locales. Leur quantité s'accroît au moins pendant les treize premiers jours après l'infection. L'inoculation, dans les mêmes conditions, d'un seul tiers de la feuille nous permet de détecter environ 10 jours après l'infection certaines de ces macromolécules dans la partie de la feuille restée saine, c'est-à-dire ne présentant, lors d'un test d'infectivité biologique, aucun pouvoir infectieux. Ces tissus sains présentent, lors d'une 2^e inoculation faite au même moment, une résistance accrue à l'infection (immunité acquise). Celle-ci, mise en évidence par Ross ^[(7), (8)] se manifeste par une diminution du nombre et de la taille des lésions locales : l'installation du virus est inhibée et l'arrêt de la multiplication virale est plus rapide. Ce phénomène est considéré comme déterminé par les mêmes mécanismes que ceux qui conduisent à la formation des lésions locales ⁽⁹⁾.

Nous avons aussi inoculé le *Nicotiana Xanthi* n. c. à 20 °C avec la souche Aucuba du V. M. T. purifiée au Laboratoire par E. Boudon ⁽¹⁾. Cette souche, qui donne aussi des lésions locales sur le *Nicotiana Xanthi* n. c. à 20 °C, nous a permis de mettre en évidence, dans les cellules vivantes entourant la nécrose, les mêmes macromolé-

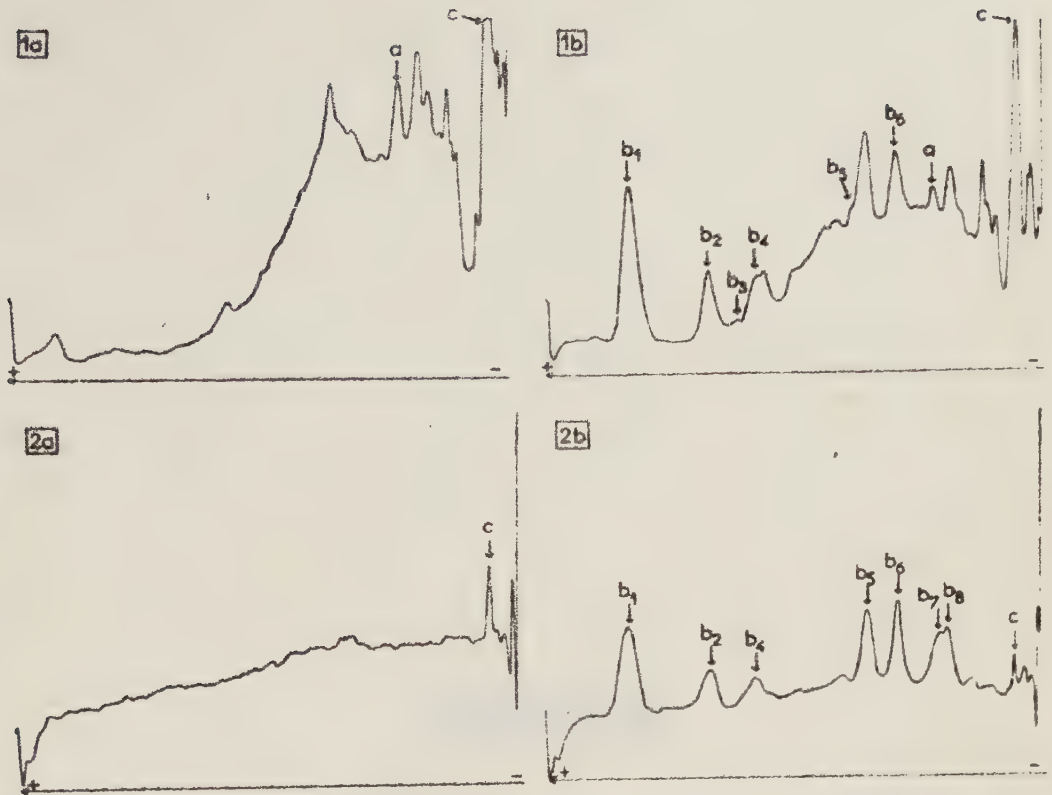


Fig. 1 a. — Enregistrement en pourcentage de transmission, effectué sur gel de polyacrylamide à 10 % après électrophorèse des protéines solubles de feuilles de : *Nicotiana Xanthi* n. c. sain à 15 °C.

Fig. 1 b. — *Idem.* *Nicotiana Xanthi* n. c. malade à 15 °C, 10 jours après l'infection par le V. M. T. Les nouvelles bandes qui apparaissent sont indiquées avec la lettre b. On note aussi une diminution considérable d'un certain nombre de protéines cellulaires normales, en particulier au niveau de la bande c.

Fig. 2 a. — Enregistrement en pourcentage de transmission effectué sur gel de polyacrylamide à 10 %, après électrophorèse d'une des fractions obtenue après séparation par chromatographie sur gel « Sephadex » de protéines solubles de : *Nicotiana Xanthi* n. c. sain à 15 °C. On ne voit aucun pic au niveau des bandes b.

Fig. 2 b. — *Idem.* *Nicotiana Xanthi* n. c. malade à 15 °C, 10 jours après l'infection par le V. M. T. Toute les bandes sont visibles, y compris les b₇ et b₈ qui ne le sont pas avant purification. La bande b₃ n'est pas détectée à cause de sa faible concentration.

EXPLICATION DE LA PLANCHE

Fig. 3 a. — Enregistrement en pourcentage de transmission effectué sur gel de polyacrylamide à 10 % après électrophorèse et gel d'électrophorèse des protéines solubles de : *Nicotiana Xanthi* n. c. sain à 15 °C.

Fig. 3 b. — *Idem.* *Nicotiana Xanthi* n. c. malade à 15 °C, 10 jours après l'infection par le V. M. T. Les nouvelles bandes apparues lors de la réaction d'hypersensibilité sont indiquées par la lettre b.

Fig. 3 c. — *Idem.* *Nicotiana Xanthi* n. c. malade à 15 °C, 7 jours après l'inoculation par le V. M. T. plus 3 jours à 32 °C. On note que la synthèse des nouvelles bandes apparues lors de la réaction d'hypersensibilité est inférieure à celle du témoin resté 10 jours à 15 °C (fig. 3 b). L'apparition de bande A indique que la multiplication virale a eu lieu.

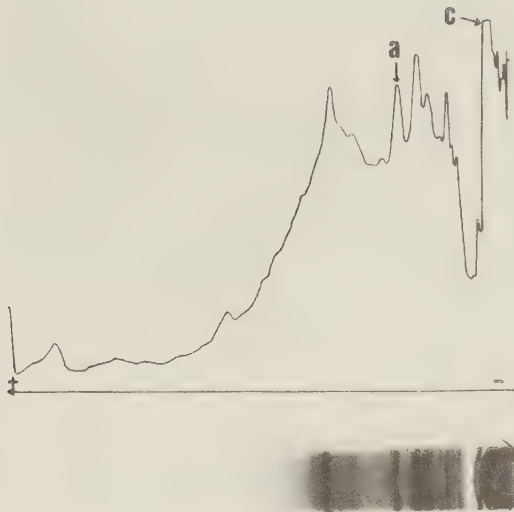


Fig. 3 a

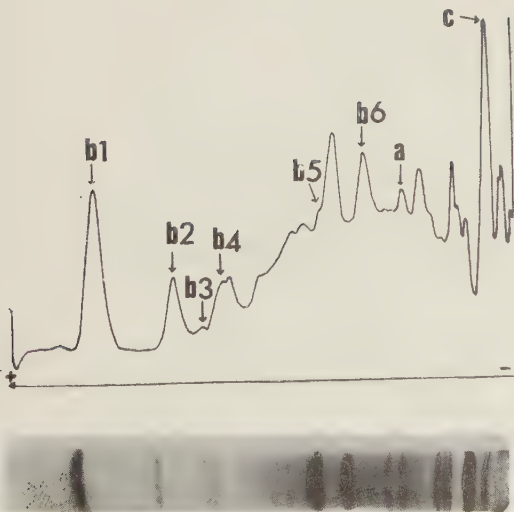


Fig. 3 b

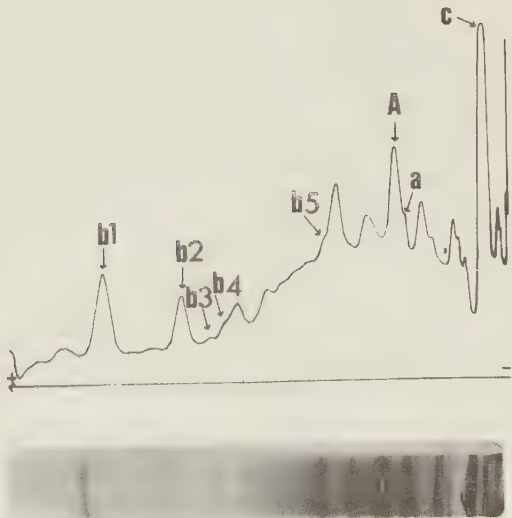


Fig. 3 c

cules (bandes *b*) avec le même coefficient de migration, que celles induites par la souche commune.

Si par contre nous infectons le *Nicotiana sylvestris*, lui aussi hypersensible à 20 °C à l'égard de la souche *Aucuba*, les macromolécules de type *b* que nous mettons en évidence sont en partie différentes d'après leur mobilité électrophorétique.

Il y a donc la même réponse pour deux virus différents (souche commune et souche *Aucuba* du V. M. T.) et le même hôte, mais des réponses différentes pour un même virus (souche *Aucuba* du V. M. T.) et deux hôtes différents (*Nicotiana Xanthi* n. c. et *Nicotiana sylvestris*).

La présence de ces macromolécules, contrairement à ce qu'affirment Van Loon et Van Kammen (¹⁰), n'est pas restreinte aux hôtes hypersensibles, car nous les avons aussi mises en évidence chez le *Nicotiana tabacum* var. *Samsun* à 20 °C et le *Nicotiana Xanthi* n. c. à 32 °C lors d'une infection systémique par le V. M. T., mais uniquement au moment où la synthèse virale est en voie d'achèvement ou vient de se terminer.

Le transfert thermique de 15 ou 20 °C à 32 °C de *Nicotiana Xanthi* n. c. présentant des lésions locales, 7 jours après l'infection par le V. M. T., diminue fortement la vitesse de synthèse des macromolécules *b* par rapport à celles des plantes restées en permanence à 15 ou 20 °C. Cependant, leur présence n'empêche pas la reprise de la multiplication virale qui se manifeste par l'apparition de la protéine virale libre de la capsid (bande A) (fig. 3 a, b, c) et par celle de virions.

La purification par chromatographie sur gel de dextrans « Sephadex » de ces macromolécules *b* montre qu'il s'agit de molécules à faible poids moléculaire.

Le spectre d'absorption réalisé sur gel de polyacrylamide au niveau de la bande *b*₁, après séparation par électrophorèse, révèle un maximum d'absorption à 280 mμ.

DISCUSSION. — Ces résultats montrent que de nouvelles macromolécules, dont la nature protéique n'est pas encore absolument prouvée, sont très probablement synthétisées par l'hôte à la suite de l'infection virale. Le fait que nous les trouvons aussi dans les tissus non infectieux d'une plante malade, permet de supposer soit qu'elles ont diffusé des cellules malades vers les cellules saines, soit qu'elles ont été synthétisées par les cellules saines sous l'influence d'une « induction » venant des cellules malades. Ces macromolécules apparaissent lors de l'arrêt de la synthèse virale, tant dans le cas d'hypersensibilité que de sensibilité (infection généralisée). Il est possible qu'elles jouent un rôle à ce niveau, mais cette hypothèse n'a pu jusqu'à présent être vérifiée.

Le rôle éventuel de ces molécules dans le processus nécrotique est exclu, puisque nous les détectons en quantité importante dans les cellules de plante infectée restées vivantes.

Si le rôle de ces molécules est bien d'arrêter la multiplication virale, nous pouvons les comparer à l'interféron, molécule protéique responsable de l'arrêt de l'infection dans les cellules animales infectées par divers virus.

Pour expliquer le fait que la multiplication virale n'est plus inhibée lors du transfert thermique de 20 °C à 32 °C, on peut supposer que la levée de l'action d'un

hypothétique répresseur, par l'élévation de la température, conduit à un déplacement de l'équilibre synthèse virale/synthèse de répresseur. Il est nécessaire qu'un autre équilibre entre ces deux facteurs s'établisse pour que l'arrêt de synthèse virale puisse de nouveau avoir lieu. A la température élevée (32 °C), ce nouvel équilibre, chez l'hôte portant le gène N dit « d'hypersensibilité », n'est pas accompagné de la mort des cellules envahies ; rien ne distingue alors le comportement des Tabacs porteurs de ce gène N de ceux qui sont sensibles.

(*) Séance du 20 avril 1970.

(1) E. BOUDON, *Comptes rendus*, 1970 (à paraître).

(2) S. GIANINAZZI, J.-C. VALLÉE et C. MARTIN, *Comptes rendus*, 268, Série D, 1969, p. 800.

(3) S. GIANINAZZI et J.-C. VALLÉE, *Comptes rendus*, 269, Série D, 1969, p. 593.

(4) C. MARTIN et M. GALLET, *Comptes rendus*, 262, Série D, 1966, p. 646.

(5) C. MARTIN et M. GALLET, *Comptes rendus*, 262, Série D, 1966, p. 997.

(6) C. MARTIN et M. GALLET, *Comptes rendus*, 263, Série D, 1966, p. 1316.

(7) A. F. ROSS, *Virology*, 1961, 14, p. 329.

(8) A. F. ROSS, *Virology*, 1961, 14, p. 340.

(9) A. F. ROSS, *Viruses of Plants*, North Holland, Publ. Co. Amsterdam, 1966, p. 127.

(10) L. C. VAN LOON et A. VAN KAMMEN, *Virology*, 1970, 40, p. 199.

(Station de Physiologie végétale, I. N. R. A.,
B. V. n° 1540, 21-Dijon, Côte-d'Or.)

ARTICLE DESTINE A ETRE PUBLIE
(PHYTOPATHOLOGISCHE ZEITSCHRIFT)

MISE EN EVIDENCE DE NOUVELLES PROTEINES LORS DE

L'INFECTION VIRALE CHEZ DIVERS NICOTIANA. par

Silvio GIANINAZZI

Claude MARTIN & Jean - Claude VALLEE

-:-:-:-:-:-:-:-:-

R E S U M E

L'électrophorèse des protéines solubles extraites de divers Nicotiana présentant une réaction d'hypersensibilité après infection par le virus de la mosaïque du tabac (T.M.V.), souche commune ou souche Aucuba, montre l'apparition de nouvelles protéines.

Certaines de ces protéines sont aussi détectées dans les tissus présentant une "immunité acquise" ainsi que lors d'une infection systémique, mais dans ce dernier cas seulement en fin de multiplication virale. Leur quantité augmente dans le temps, tandis que la teneur en protéines cellulaires normales diminue.

Ces protéines sont spécifiques de l'hôte et ne semblent être synthétisées qu'en présence de virus. Le fait qu'elles apparaissent dans les cellules et tissus présentant une résistance à la multiplication virale permet de supposer qu'elles pourraient avoir un rôle comparable à celui de l'interferon.

S U M M A R Y

The soluble proteins of different T.M.V.-hypersensitive Nicotiana species are analyzed through disc-electrophoresis. New proteins appear after hypersensitivity has occurred.

Some of these virus-induced proteins are present either in systemically-invaded tissues or in tissues having acquired immunity from inoculation. They quantitatively increase with time as the amount of normal protein decreases.

These proteins are host-specific and virus-induced. The fact that they are present in cells and tissues which do not allow viral replication seems to infer that they would play a part similar to that of the interferon.

INTRODUCTION

De nombreux travaux ont révélé l'existence de substances inhibitrices de l'infection virale chez les plantes supérieures. Parmi ces substances beaucoup sont des composants communs des végétaux (Bawden, 1954). Ainsi ALLard (1918) chez le Phytolacca decandra, Duggar et Armstrong (1925) chez le Datura stramonium, Grant (1934) chez le Spinacia oleracea, pour ne citer que quelques exemples, ont été parmi les premiers à mettre en évidence des substances qui, lorsqu'elles sont extraites et mélangées avec un inoculum viral, inhibent l'installation de différents virus. Le même phénomène a été signalé avec des extraits d'autres organismes tels que les champignons et les bactéries (Johnson & Hoggan, 1937), les insectes (Black, 1939), les mollusques (Signoret, 1964).

Dans le domaine végétal, ces inhibiteurs existent chez les plantes apparemment saines et leur présence ne semble donc pas due à une infection virale. Leur action, au cours d'une atteinte virale, serait le résultat d'une compétition avec le virus au niveau de sites récepteurs (Ragetti, 1957 ; Van Kammen, Noordam & Thung, 1961).

Outre ce type de résistance, dite "passive", à l'infection virale, des travaux ultérieurs ont montré l'existence chez les plantes d'un autre type de résistance dite "induite".

Ainsi, Gilpatrick & Weintraub (1952), travaillant sur des plantes d'un clone de Dianthus barbatus, montrent le développement d'une résistance systémique dans les feuilles non inoculées du sommet, quelque temps après l'infection des feuilles basales avec le virus de la mosaïque de l'oeillet. Les feuilles présentant cette forme de résistance sont indemnes de virus. Malheureusement ce type d'expérience n'a pu être prolongé au-delà de 2 ans et demi (Weintraub & Kemp 1961).

Yarwood (1953, 1960) et Ross (1961 a) mettent en évidence l'apparition d'une résistance acquise localisée à l'égard du virus de la mosaïque du tabac (T.M.V.) dans les tissus entourant les lésions nécrotiques induites par inoculation du T.M.V. à des feuilles de Phaseolus vulgaris var. Pinto et Nicotiana tabacum var. Samsun NN. Poursuivant ces expériences Ross (1961 b) met en évidence le développement d'une résistance acquise systémique dans les tissus libres

de virus de Nicotiana tabacum var. Samsun NN, après inoculation avec un virus qui induit la formation de lésions locales. Les lésions dans les parties résistantes sont beaucoup plus petites (Ross, 1961 b) et généralement moins nombreuses (Loebenstein, 1963).

Ross (1961 b) et Bozarth & Ross (1964) montrent de plus que le développement de la résistance acquise dépend du déplacement d'une ou de plusieurs substances issues des feuilles infectées vers les régions non infectées de la plante. Loebenstein & Ross (1963), après inoculation des feuilles basales de Datura stramonium avec le T.M.V. ou le virus de la nécrose du tabac, préparent un extrait actif à partir des feuilles apicales présentant une résistance systémique acquise. Cet extrait, mélangé avec le T.M.V. et inoculé au Nicotiana glutinosa, réduit fortement le nombre de lésions locales. Loebenstein & Ross (1963) et Loebenstein, Rabina & Van Praagh (1966), après des essais de purification et d'identification, ont suggéré que la substance inhibitrice pourrait être une protéine de faible poids moléculaire comparable par certaines de ses propriétés à l'interferon.

Un facteur antiviral (A.V.F.) a aussi été trouvé dans les feuilles de Nicotiana glutinosa infecté par le T.M.V. (Sela & Applebaum, 1962). Après séparation par électrophorèse sur papier, il a été identifié comme étant de l'acide ribonucléique (Sela, Harpaz & Birk, 1966).

Un autre facteur antiviral, également de nature ribonucléique, a pu être extrait des zones de résistance systémique induite chez le Chenopodium amaranticolor, le Phaseolus vulgaris v. Prince et le Nicotiana glutinosa (Kimmins, 1969).

L'induction de la résistance acquise localisée est sensible à l'actinomycine D (Loebenstein, Rabina & Van Praagh, 1968) et au chloramphénicol (Sela, Loebenstein & Van Praagh, 1969). Cela semble indiquer que cette résistance acquise est le résultat de la biosynthèse par l'hôte d'une substance interférant avec la multiplication virale.

Enfin Chadha & Mac Neill (1969) ont isolé un principe antiviral (A.V.P.) de Lycopersicon esculentum Mill. var. Bonny Best après infection systémique par le T.M.V. La production de l'A.V.P. n'est accompagnée dans ce cas d'aucun signe évident d'hypersensibilité ou de nécrose.

Or, dernièrement, (Gianinazzi, Vallée & Martin, 1969 ; Gianinazzi, Martin & Vallée, 1970 ; Van Loon & Van Kammen, 1970) il a été mis en évidence chez le Nicotiana Xanthi n.c. et le Nicotiana tabacum var. Samsun NN un nouveau groupe de protéines dans les zones présentant une résistance acquise. Ces protéines semblent également exister, dans certaines conditions, chez le Nicotiana tabacum var. Samsun lors d'une infection systémique par le T.M.V. (Gianinazzi et col., 1970).

Le but de cet article est de préciser les conditions d'apparition de ces nouvelles protéines. Une hypothèse quant à leur rôle éventuel dans l'arrêt de la synthèse virale est discutée.

METHODES

I - Hôtes et parasites :

a) HOTES : - Nicotiana Xanthi n.c., hypersensible au T.M.V., souche commune et souche Aucuba, aux températures inférieures à 29-30°C et sensible aux températures supérieures.

- Nicotiana tabacum var. Samsun, sensible au T.M.V., souche commune et souche Aucuba.

- Nicotiana sylvestris, hypersensible au T.M.V., souche Aucuba, mais sensible à la souche commune.

b) PARASITES

- Virus de la mosaïque du tabac (T.M.V.) souche commune et souche Aucuba. Cette dernière est thermosensible : aux températures inférieures à 29-30°C, elle donne des lésions locales sur Nicotiana Xanthi n.c; et Nicotiana sylvestris. A 33°C sa multiplication est fortement inhibée (Boudon, Martin & Carré, 1970).

- Un virus récemment mis en évidence par E. Perdrizet & R. Verney (V.P.V.) mais non encore identifié et donnant des lésions locales sur les Nicotiana ci-dessus indiqués (résultats non publiés).

II - Techniques d'étude des protéines solubles.

a) extraction : méthode de Staples & Stahmann (1964) légèrement modifiée : broyage à + 2°C dans un tampon tris-HCl 0,1 M., pH 8,0, 0,5 M saccharose et 0,3 % mercaptoéthanol. Clarification du broyat (centrifugation 30.000 g/15 mn et centrifugation 100.000 g/60 mn.)

b) purification : chromatographie sur gel de dextrane "Sephadex" G-100. Tampon d'élution : Tris - HCl 0,1 M, pH 8,0, 0,3 % mercaptoéthanol.

c) analyse des acides aminés à l'aide de l'autoanalyseur Technicon après hydrolyse acide.

d) Electrophorèse :

- selon la méthode de Ornstein (1964) et Davis (1964) sur gel de polyacrylamide à 10 %. Tampon de séparation tris-glycine, 0,05 M, pH 8,3.

Valeur de l'échantillon : 30 µl.

- coloration au noir amido dans une solution d'acide acétique à 7 %.

- décoloration par électrophorèse dans de l'acide acétique à 7 %.

- enregistrement, soit dans le visible à l'aide du densitomètre Kipp & Zonen, soit dans l'ultraviolet, sur gels non colorés, fixés à l'acide trichloracétique à 10 %, à l'aide du spectrophotomètre Gilford.

RESULTATS

I - Mise en évidence de nouvelles protéines lors de la réaction d'hypersensibilité.

a) Etude chez le Nicotiana Xanthi n.c. à 20°C.

L'étude par électrophorèse des protéines solubles de Nicotiana Xanthi n.c., infecté par le T.M.V. souche commune, à 20°C, révèle la présence de nouvelles protéines (fig. Ia et Ib). Ces macromolécules progressivement détectables à partir de 50 heures après l'infection (c'est-à-dire environ 14 heures après l'apparition des symptômes nécrotiques) sont nettement visibles sur l'électro-

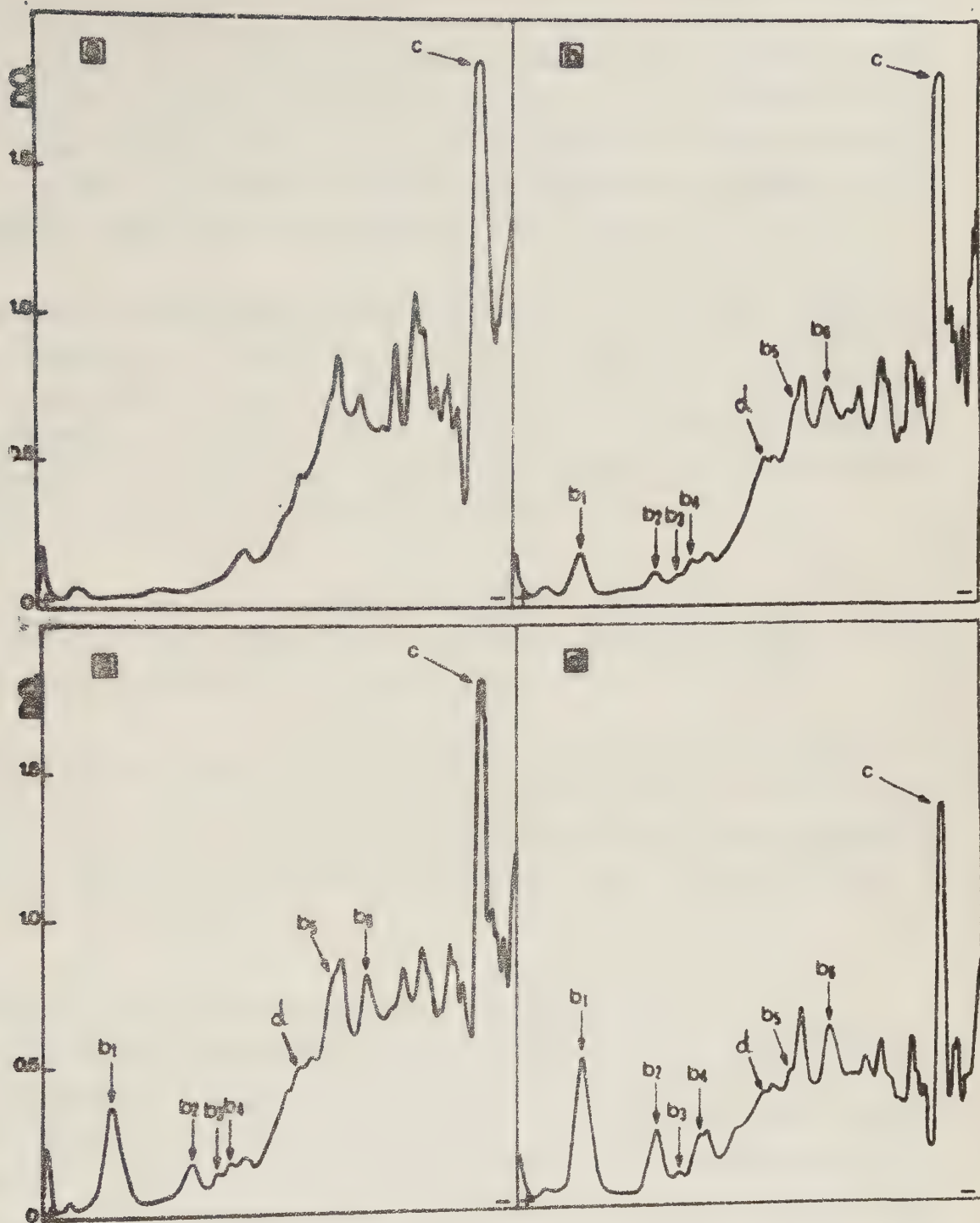


Fig. 1 - Electrophorèse des protéines solubles de Nicotiana Xanthi n. c.

a) sain à 20°C

b) malade à 20°C, 4 jours après l'infection par le T.M.V. souche commune

c) malade à 20°C, 7 jours après l'infection par le T.M.V. souche commune

d) malade à 20°C, 10 jours après l'infection par le T.M.V. souche commune.

Les nouvelles protéines sont indiquées avec la lettre "b". La lettre "d" n'indique très vraisemblablement qu'une différence quantitative.

phorégramme entre 72 heures et 96 heures selon le nombre de lésions locales. En effet la quantité de ces protéines, présentes dans les zones non nécrotiques des feuilles malades, est proportionnelle au nombre de sites infectieux. Si le nombre de lésions locales n'est pas trop grand et permet à la feuille inoculée de survivre, on voit que la concentration de ces macromolécules augmente en fonction du temps (au moins jusqu'à 10 jours) (fig. 1b, 1c, 1d).

L'inoculation de Nicotiana Xanthi n.c. avec le T.M.V. souche Aucuba, dans les mêmes conditions que la souche commune, révèle l'apparition des mêmes macromolécules en quantité et proportions comparables. Cela est montré par électrophorèse d'un mélange, en quantités égales, de solutions de protéines isolées de Nicotiana Xanthi n.c. inoculés soit avec la souche commune soit avec la souche Aucuba du T.M.V. (coélectrophorèse)(fig. 2a et 2b).

Ces protéines sont donc présentes en quantité importante dans les tissus où il se trouve du virus biologiquement actif, mais cependant incapable d'imposer son information génétique à la cellule (Martin & Callet, 1966, b).

Par ailleurs on constate que la synthèse de ces nouvelles macromolécules dans les cellules de plantes malades s'accompagne d'une diminution de la teneur en protéines normalement existantes chez les plantes saines. Cette diminution est particulièrement visible au niveau de la bande nommée ici bande "c" (fig. 1a et 1d).

b) Etude chez le Nicotiana sylvestris à 20°C.

La même étude électrophorétique des protéines solubles, effectuée sur le Nicotiana sylvestris, infecté par le T.M.V. souche Aucuba, révèle aussi l'apparition d'un groupe de nouvelles protéines (fig. 3a et 3b). Comme chez le Nicotiana Xanthi n.c., elles se trouvent dans les zones non nécrotiques des feuilles malades et leur teneur augmente aussi, avec le temps, tandis que les protéines cellulaires normales diminuent. Le nombre et la quantité de chacune de ces macromolécules ne sont pas identiques à ceux trouvés chez le Nicotiana Xanthi n.c. En effet la coélectrophorèse réalisée après mélange des solutions de protéines isolées de Nicotiana Xanthi n.c. et de Nicotiana sylvestris, tous deux infectés avec le T.M.V. souche Aucuba, montre bien les différences qualitatives et quantitatives existant au niveau de ces nouvelles molécules. En particulier, la bande b_0 est absente du Nicotiana Xanthi n.c. (fig. 2a) et présente chez le Nicotiana sylvestris ; c'est l'inverse pour la bande b_2 . De plus, la bande b_3

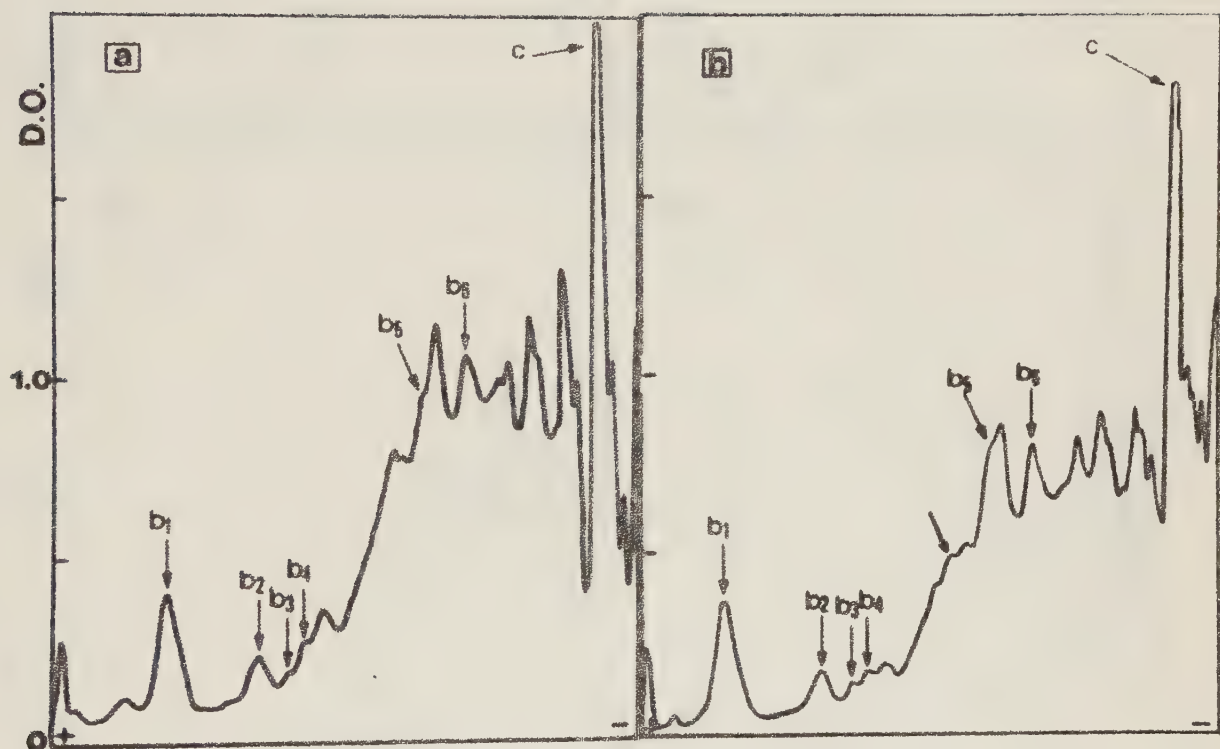


Fig. 2 - a) Electrophorèse des protéines solubles de Nicotiana Xanthi n. c. malade à 20°C, 7 jours après l'infection par le T.M.V. souche Aucuba.
 b) coélectrophorèse réalisée après avoir mélangé, en quantités égales, les solutions de protéines de Nicotiana Xanthi n. c. malade à 20°C, 7 jours après l'infection par le T.M.V. souche commune et de Nicotiana Xanthi n. c. malade à 20°C, 7 jours après l'infection par le T.M.V. souche Aucuba.
 Pour détail voir fig. 1.

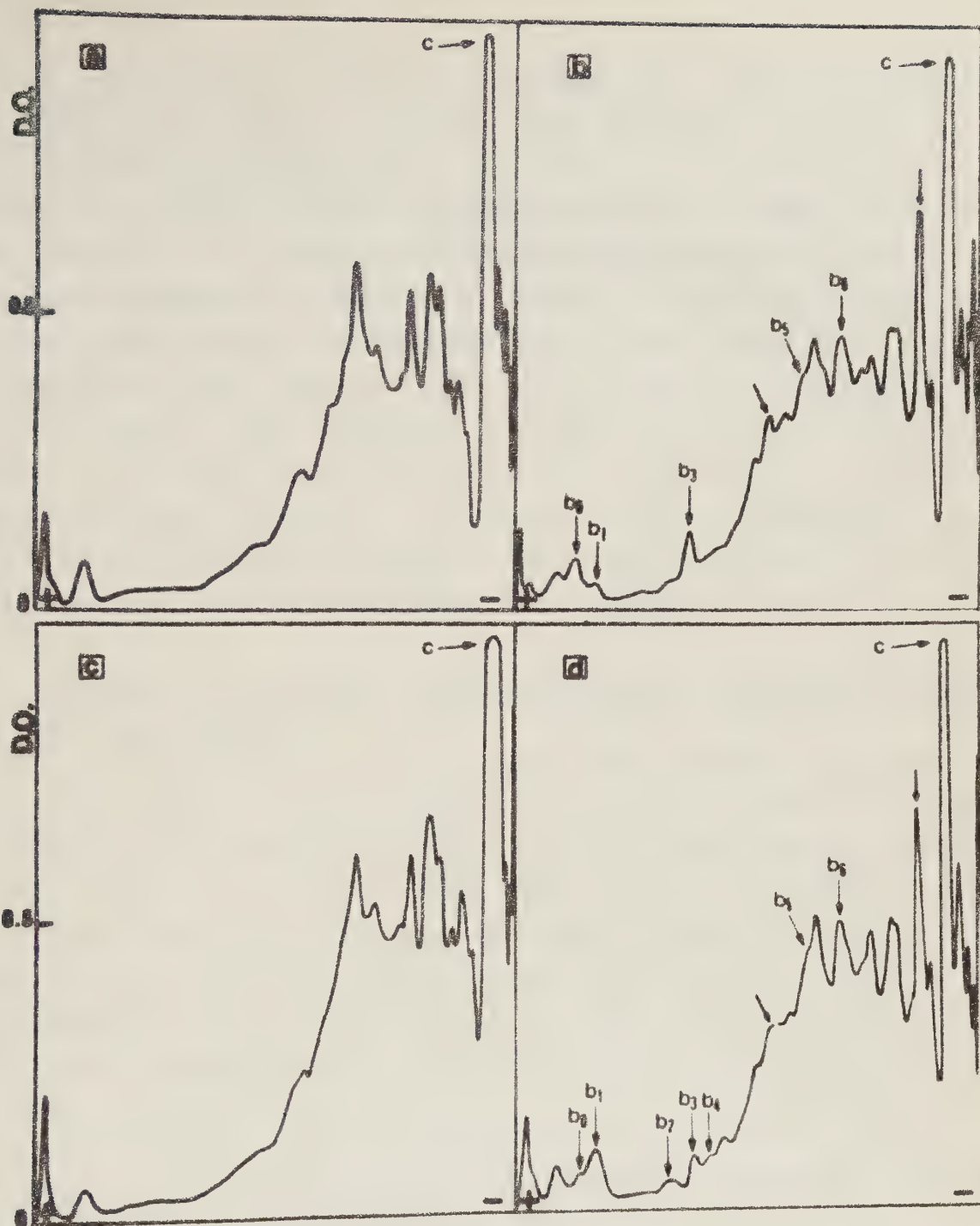


Fig. 3 - En haut : Electrophorèse des protéines solubles de Nicotiana sylvestris

a) sain à 20°C

b) malade à 20°C, 4 jours après l'infection par le T.M.V. souche Aucuba.

En bas : coélectrophorèse réalisée après avoir mélangé, en quantités égales, les solutions de protéines de Nicotiana sylvestris et de Nicotiana Xanthi n. c. :

c) sain à 20°C.

d) malade à 20°C, 4 jours après l'infection par le T.M.V. souche Aucuba.

b_0 indique une bande spécifique du Nicotiana sylvestris malade à 20°C, après infection par le T.M.V. souche Aucuba.

Pour détail voir fig. 1.

est présente chez le Nicotiana sylvestris en quantité plus importante que chez le Nicotiana Xanthi n.c. (fig. 3c, 3d). Par contre la teneur en b_I est moins importante chez le Nicotiana Sylvestris

Or, les expériences décrites ci-dessus montrent que la souche Aucuba et la souche commune du T.M.V. induisent chez le Nicotiana Xanthi n.c., dans les cellules vivantes entourant la nécrose, la synthèse de macromolécules identiques quant à leurs propriétés électrophorétiques. Il y a donc, d'après ce critère, la même réponse pour deux virus différents (souche commune et souche Aucuba du T.M.V.) et le même hôte (Nicotiana Xanthi n.c.) mais des réponses différentes pour un même virus (souche Aucuba du T.M.V.) et deux hôtes différents (Nicotiana sylvestris et Nicotiana Xanthi n.c.). En d'autres termes nous pouvons dire que dans ces conditions d'analyse la synthèse de ces nouvelles protéines lors de la réaction d'hypersensibilité semble spécifique de l'hôte.

c) Condition de l'apparition des nouvelles protéines dans les tissus présentant une "immunité acquise".

L'inoculation à 20°C du seul tiers apical d'une feuille de Nicotiana Xanthi n.c. par le T.M.V., souche commune ou Aucuba, permet de détecter, II jours après l'infection, ces nouvelles protéines, ou tout au moins certaines d'entre elles, dans la partie de la feuille restée saine, c'est-à-dire ne présentant, lors d'un test d'infectivité biologique, aucun pouvoir infectieux (fig. 4a et 4b). Dans ces conditions, c'est essentiellement la bande b_I que nous pouvons mettre en évidence. Toutefois les autres bandes, quoique difficilement visibles sur l'électrophorégramme, semblent bien présentes dans la partie non inoculée de la feuille. Or, on sait que ces tissus présentent, lors d'une deuxième inoculation, une résistance accrue à l'infection ("immunité acquise" : fig. 4c) (Ross 1961 b) : l'installation du virus y est inhibée ou lorsqu'elle a lieu, la multiplication virale y est plus rapidement arrêtée.

II - Mise en évidence de certaines de ces nouvelles protéines lors de l'infection systémique.

a) Etude chez le Nicotiana Xanthi n.c. à 32°C.

La réaction d'hypersensibilité à 20°C chez le Nicotiana Xanthi n.c. à l'égard du T.M.V. peut être supprimée en plaçant ce tabac à 32°C après l'infection. A cette température, le virus envahit toute la plante et l'infection devient systématique : il n'y a alors aucun signe de nécrose, la plante ralentit

sa croissance, mais elle ne meurt pas et la multiplication du virus s'arrête au bout de quelques semaines, dans les feuilles ayant terminé leur croissance. L'étude, par les techniques décrites ici, des protéines solubles au cours de la multiplication virale ne révèle aucune variation qualitative ; seule la présence de la protéine de la capsid virale (Gianinazzi & Vallée, 1969) permet de distinguer un électrophorégramme de plante malade de celui d'une plante saine. Par contre, si on analyse des feuilles dont la croissance est terminée et dans lesquelles la multiplication virale est achevée, il est possible de détecter certaines des nouvelles protéines mises en évidence lors de la réaction d'hypersensibilité. On note en particulier la présence des bandes b_1 et b_2 (fig. 5a et 5b). Ce type d'expérience a été réalisé 7 semaines après l'infection par le T.M.V. ; il nous paraît opportun de préciser que les plantes avaient fleuri, mais qu'elles présentaient un ou plusieurs rameaux végétatifs en voie de développement à l'aiselle des dernières feuilles (Martin & Gallet, 1966, a). La coélectrophorèse réalisée avec les protéines solubles extraites d'un témoin resté à 20°C, mais inoculé seulement depuis 4 jours, montre bien qu'il s'agit des mêmes protéines que celles détectées lors de la réaction d'hypersensibilité (fig. 6a et 6b).

b) Etude chez le *Nicotiana tabacum* var. Samsun à 20°C.

Il est également possible de déceler chez le *Nicotiana tabacum* var. Samsun certaines de ces nouvelles protéines lors de l'infection systémique par le T.M.V. souche commune et souche Aucuba. Comme pour le *Nicotiana Xanthi* n.c. il faut se placer dans des conditions bien précises pour pouvoir révéler leur présence ; il faut choisir une feuille ayant terminé sa croissance et dans laquelle la multiplication virale est achevée, ou tout au moins en voie d'achèvement. Pour cela, il est nécessaire d'attendre plusieurs semaines : le tabac est donc à l'état floral au moment du prélèvement de l'échantillon. Ces expériences ont été réalisées pour les souches commune et Aucuba respectivement 5 semaines et 7 semaines après l'infection. Cela a permis de mettre en évidence, sur l'électrophorégramme des plantes malades, les bandes b_1 et b_2 (fig. 7a, 7b, 7c et 7d). Il s'agit des mêmes bandes que celles trouvées lors de l'infection chez le *Nicotiana Xanthi* n.c. à 32°C par la souche commune (voir ci-dessus) (fig. 5). Notons ici que la protéine de la capsid virale (bande A) diminue dans les tissus infectés en fin de multiplication virale.

Pour résumer ces premiers résultats nous pouvons dire que :

I°) - La présence de nouvelles protéines n'est pas liée à la formation de la nécrose. En effet, comme nous le montrons, elles apparaissent aussi lors

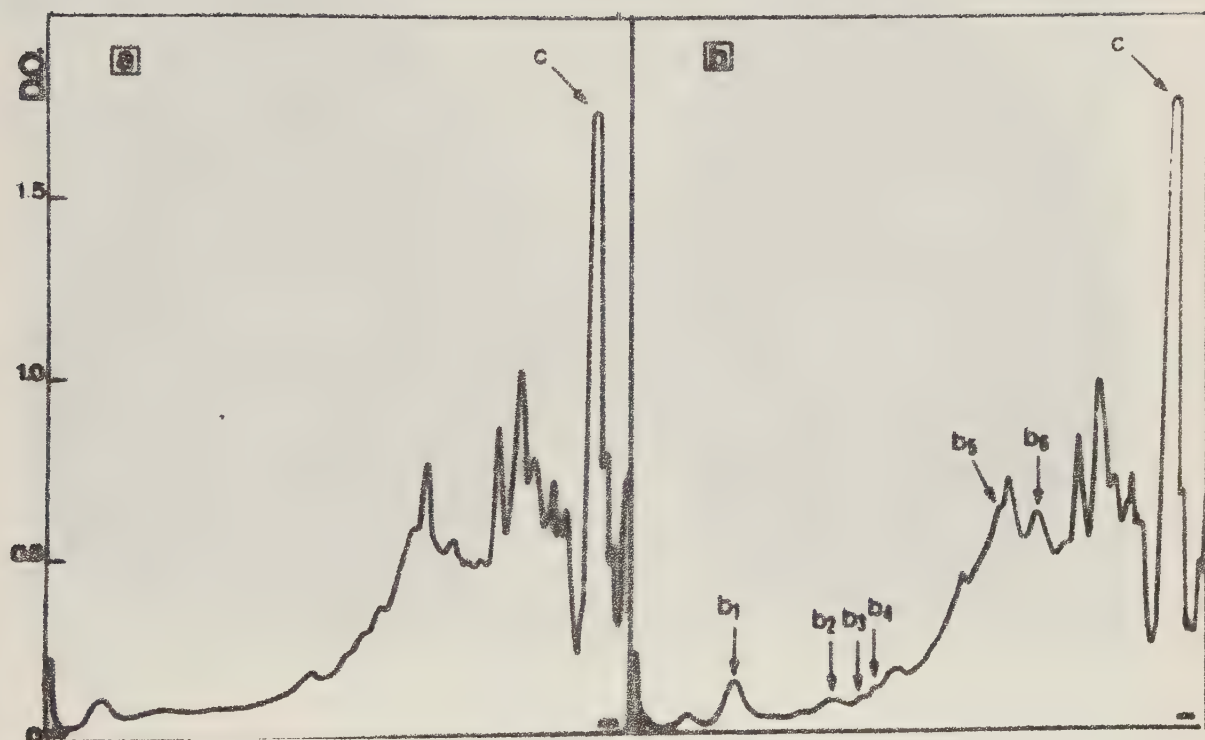


Fig. 4. - Electrophorèse des protéines solubles de *Nicotiana Xanthi* n.c.
 - a) sain à 20°C.
 - b) partie saine d'une feuille partiellement infectée avec le T.M.V. souche commune.



Fig. 4 C - Feuilles de *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n. c. inoculées avec le V.M.T.

- a) dans la partie proximale et 10 jours après aussi dans la partie distale —————> immunité acquise.
- b) dans la partie distale, 10 jours après avoir inoculé la partie proximale avec de l'eau —————> pas "d'immunité acquise".

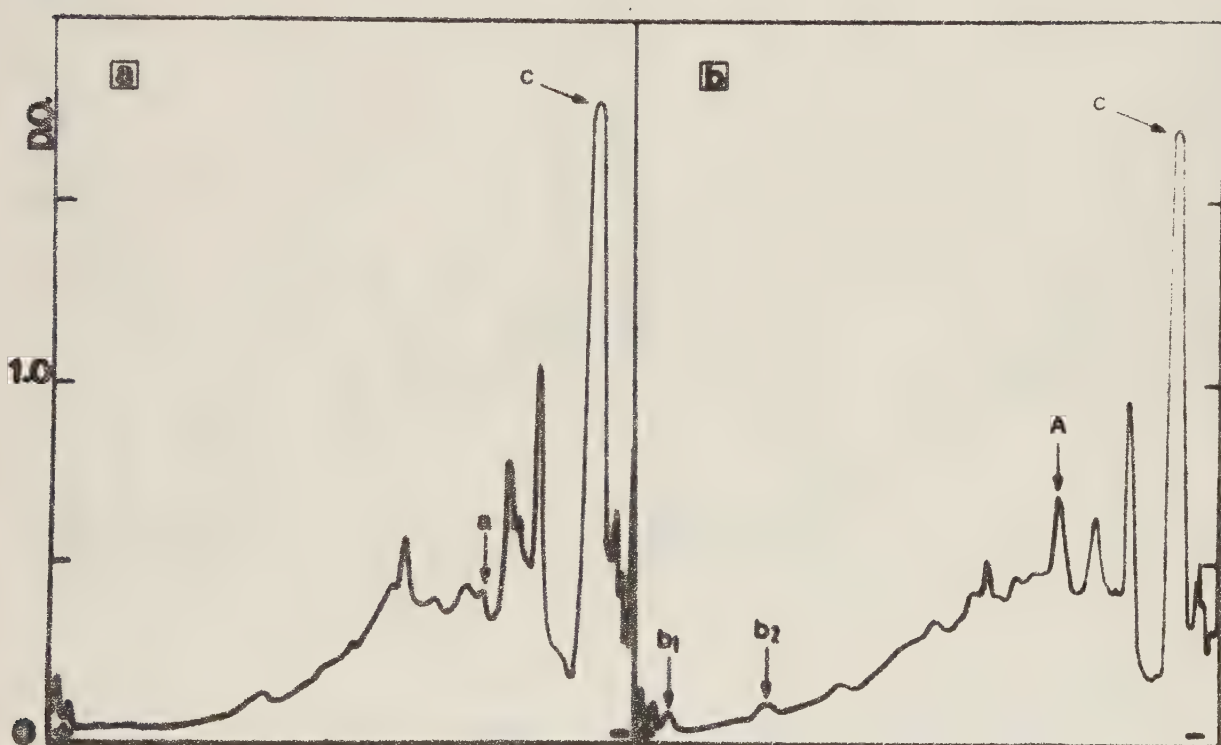


Fig. 5. - Electrophorèse des protéines solubles de Nicotiana Xanthi n.c.
 - a) sain à 32°C.
 - b) malade à 32°C, 7 semaines après l'infection par le T.M.V. souche commune.
 On note deux nouvelles bandes de protéines (bande b_1 et b_2), ainsi que la protéine virale libre (bande A) qui se superpose à une protéine cellulaire normale (bande a).

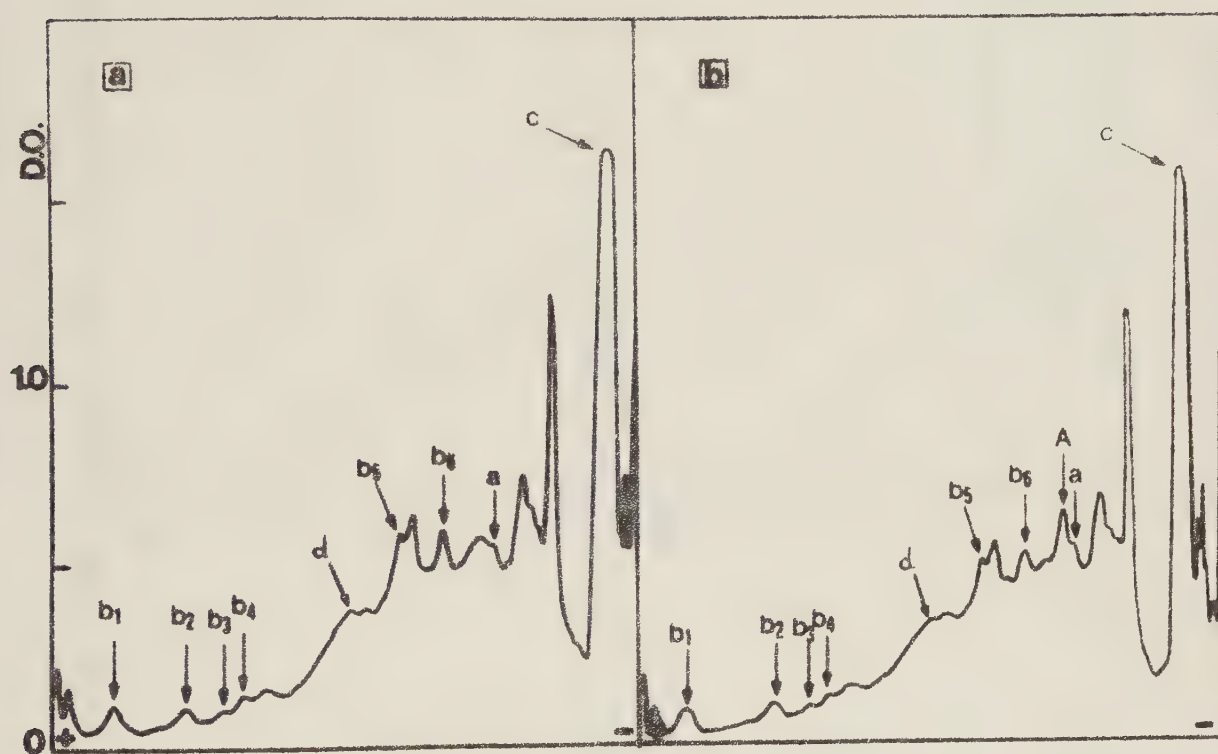


Fig. 6. - a) Electrophorèse des protéines solubles de *Nicotiana Xanthi* n.c. malade à 20°C, 4 jours après l'infection par le T.M.V. souche commune.
 - b) Coélectrophorèse réalisée après avoir mélangé, en quantités égales, les solutions de protéines de *Nicotiana Xanthi* n.c. malade à 20°C, 4 jours après l'infection par le T.M.V. souche commune et de *Nicotiana Xanthi* n.c. malade à 32°C, 7 semaines après l'infection par le T.M.V. souche commune.

Les bande b₁ et b₂ qui apparaissent lors de l'infection systémique, se superposent parfaitement aux bandes correspondantes caractéristiques de la réaction d'hypersensibilité.
 Pour détail voir fig. 1 et 5.

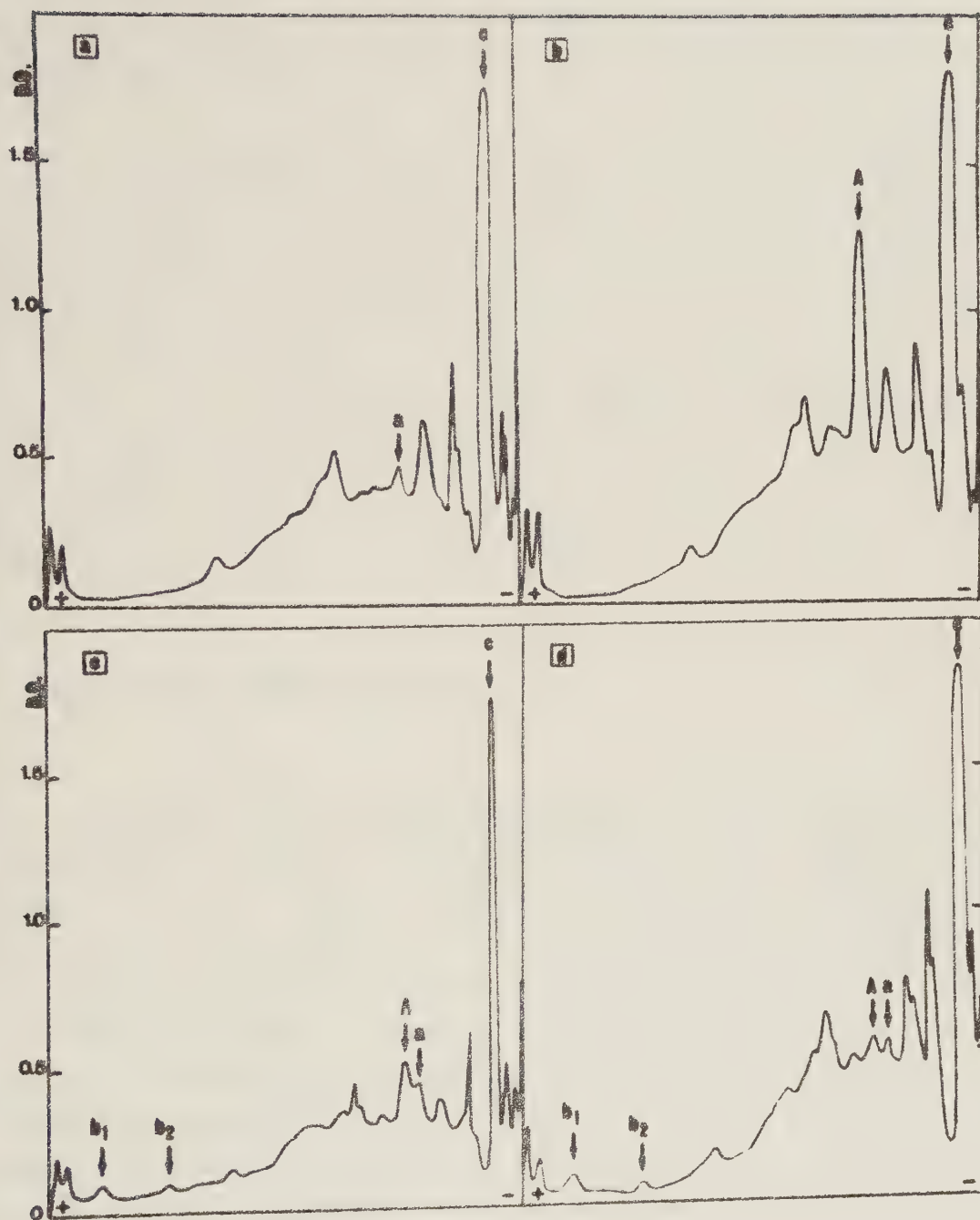


Fig. 7. - Electrophorèse des protéines solubles de Nicotiana tabacum var. Samsun
 - a) sain à 20°C.
 - b) malade à 20°C, 3 semaines après l'infection par le T.M.V. souche commune.
 - c) malade à 20°C, 5 semaines après l'infection par le T.M.V. souche commune.
 - d) malade à 20°C, 7 semaines après l'infection par le T.M.V. souche Aucuba.

Pour détail voir fig. 1 et 5.

d'une infection systémique. D'autre part, la production de nécroses sans le concours d'aucun virus (brûlures, action de substances chimiques toxiques), n'est pas accompagnée de l'apparition de ces macromolécules dans les tissus vivants voisins. Ces dernières ne sont donc vraisemblablement pas un produit de dégradation issu du processus nécrotique.

2°) - Ces nouvelles protéines ne sont pas liées à la présence du gène N, dont dépend l'hypersensibilité. Elles existent en effet chez le Nicotiana tabacum var. Samsun lors d'une infection systémique par le T.M.V. souche commune ou souche Aucuba. Mais c'est surtout grâce à un virus non encore identifié, isolé dans notre Laboratoire par E. Perdrizet & R. Vernoy (V.P.V.), qui provoque la formation de lésions locales chez tous les Nicotiana éprouvés, qu'il a été possible de les mettre en évidence en grande quantité chez le Nicotiana tabacum var. Samsun, 4 jours après l'infection par ce virus (fig. 7a et 8b). Dans ce cas aussi elles apparaissent dans les tissus présentant une résistance au développement de l'infection virale et leur quantité augmente en fonction du temps.

III - Effet d'un transfert thermique.

Si on place à 32°C des Nicotiana Xanthi n.c. infectés avec le T.M.V. souche commune et présentant des lésions locales, le virus quitte les tissus entourant la nécrose et envahit l'ensemble de la plante. La répression de synthèse virale est donc levée et le tabac devient sensible. Or, même si le transfert thermique est effectué plusieurs jours après l'apparition des lésions locales, c'est-à-dire quand la quantité de protéines "b" présentes dans les cellules est très importante, la multiplication virale reprend cependant. Par contre, la teneur en macromolécules "b", par rapport à celle des plantes restées en permanence à 20°C, diminue fortement. La synthèse virale se manifeste sur l'électrophorogramme par l'apparition de la protéine virale libre de la capside (bande A) (fig. 9a et 9b).

IV - Essais de caractérisation

a) Purification

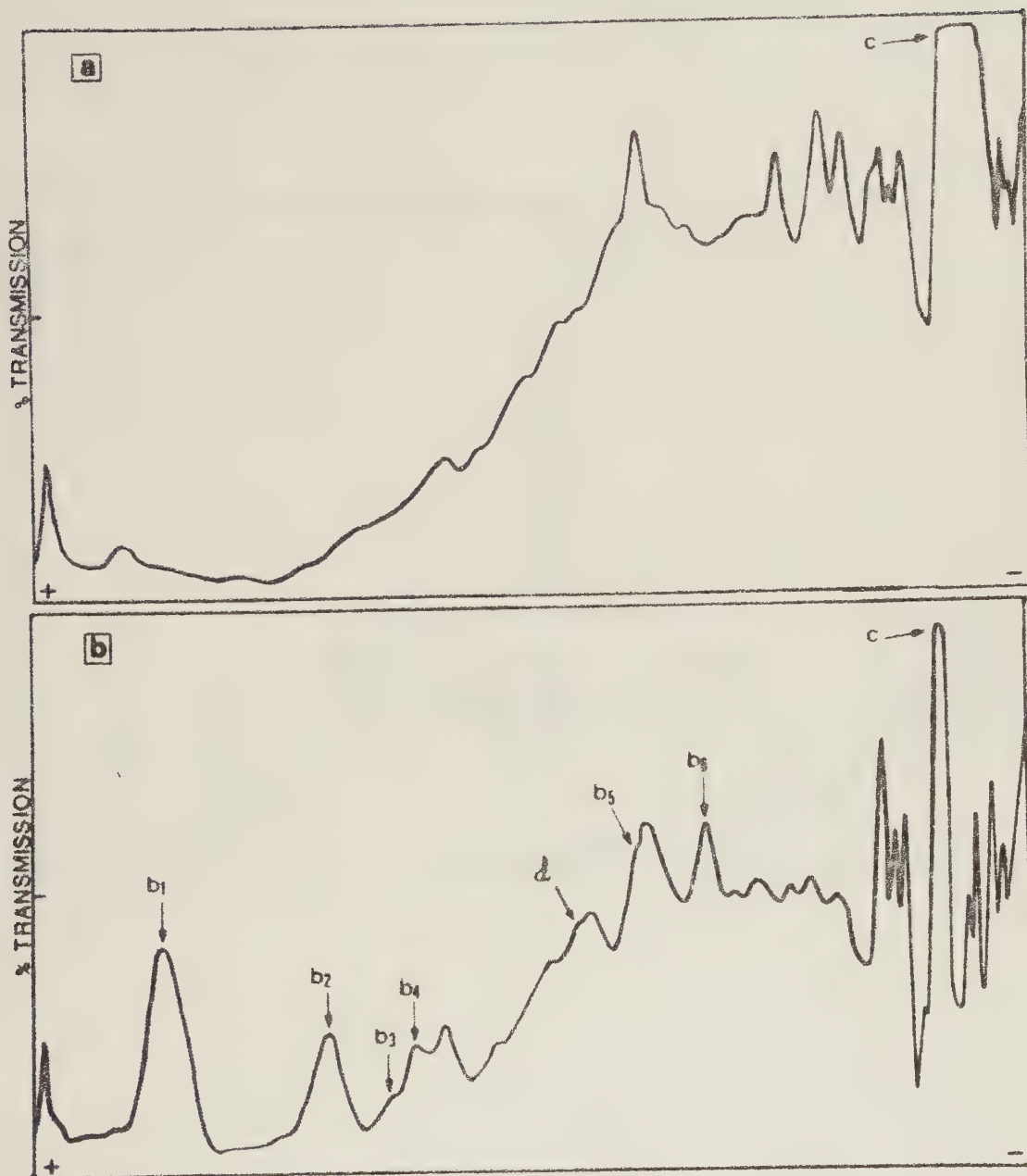


Fig. 8. - Electrophorèse des protéines solubles de Nicotiana tabacum var. Samsun :
 - a) sain à 20°C.
 - b) malade à 20°C, 7 jours après l'infection par le V.P.V.
 Pour détail voir fig. 1.

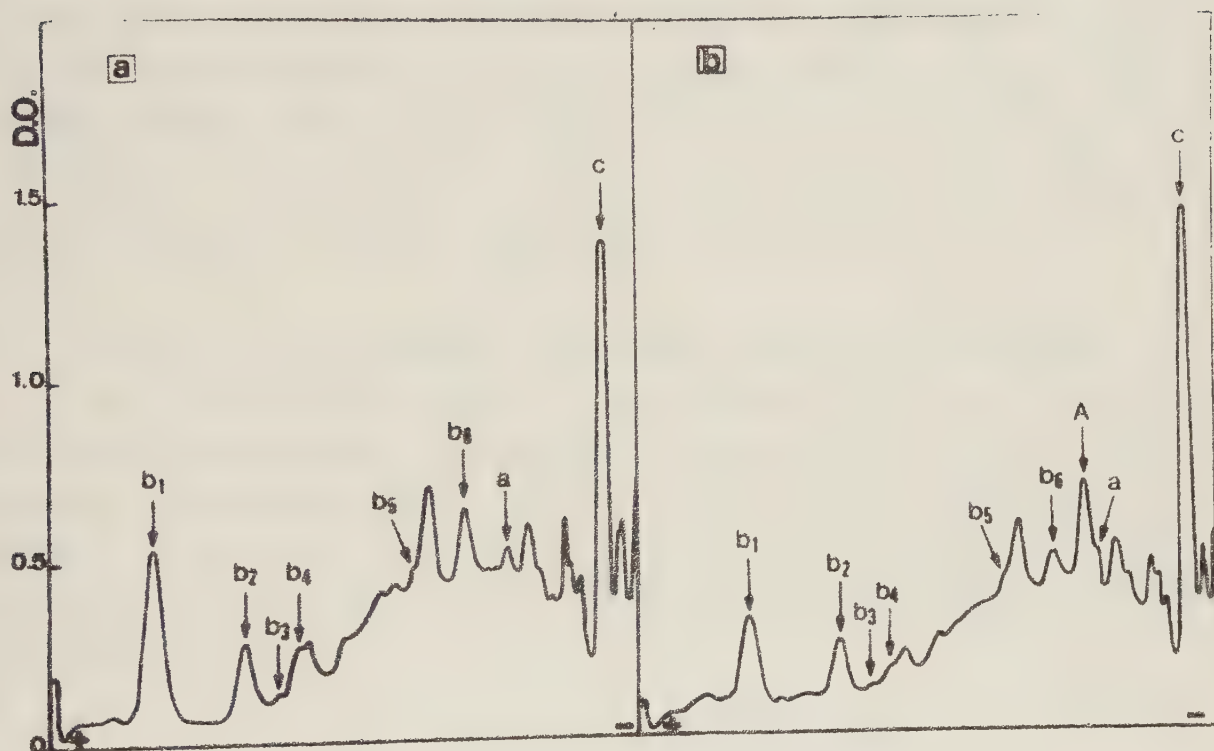


Fig. 9. - Electrophorèse des protéines solubles de *Nicotiana Xanthi* n.c.
 - a) malade à 20°C, 10 jours après l'infection par le T.M.V. souche commune.
 - b) malade, après infection par le T.M.V. souche commune, 7 jours à 20°C plus 3 jours à 32°C.
 Pour détail voir fig. 1 et 5.

La purification est réalisée sur colonne de gel de dextrane "Sephadex" G-100 après extraction des protéines solubles de feuilles de Nicotiana Xanthi n.c. sains et infectés par le T.M. . souche commune. La fraction protéique est ainsi séparée d'un certain nombre de contaminants (Phénols). Mais d'autre part, il est également possible de séparer à la sortie de la colonne les protéines en fonction de leur poids moléculaire.

Ce procédé a permis de mettre en évidence l'existence des bandes b_5 et b_6 qui, d'après les électrophorégrammes complets, ne semblaient être que des variations quantitatives. De plus, deux nouvelles bandes b_7 et b_8 , invisibles sur le diagramme total, sont ainsi mises en évidence. Le témoin sain analysé dans les mêmes conditions ne révèle la présence d'aucune de ces bandes (fig. 10a et 10b). Enfin l'ordre de sortie des macromolécules "b" nous permet de dire qu'il s'agit de molécules de faible poids moléculaire.

b) Analyse de la composition en acides aminés de la protéine b_I

Des analyses actuellement en cours semblent montrer que la bande b_I est constituée par un type de protéine particulièrement riche en acides aminés aromatiques. L'absorption à 280 m μ confirme ce dernier point : on constate que l'importance relative des pics de ces protéines par rapport à ceux des protéines normales est plus grande que celle obtenue dans le visible après coloration au Noir Amido (Fig. II).

DISCUSSION

De nouvelles protéines sont synthétisées dans les cellules et tissus présentant une résistance à la multiplication virale : on les détecte autour des lésions locales, dans les tissus présentant une résistance acquise, et lors de l'arrêt de l'infection systémique. Leur quantité augmente dans le temps, tandis que la teneur en protéines cellulaires normales diminue. Parmi celles-ci une bande appelée "c", qui semble liée au système photosynthétique (Dulieu, 1970), est particulièrement affectée. La biosynthèse de ces macromolécules est spécifique de l'hôte, mais elle semble induite par l'infection virale. Nous n'avons pas encore pu donner une base organique à cette induction. Si le rôle de ces protéines est d'arrêter la multiplication virale, elles peuvent être comparées à l'interféron, molécule protéique responsable de l'arrêt de l'infection dans

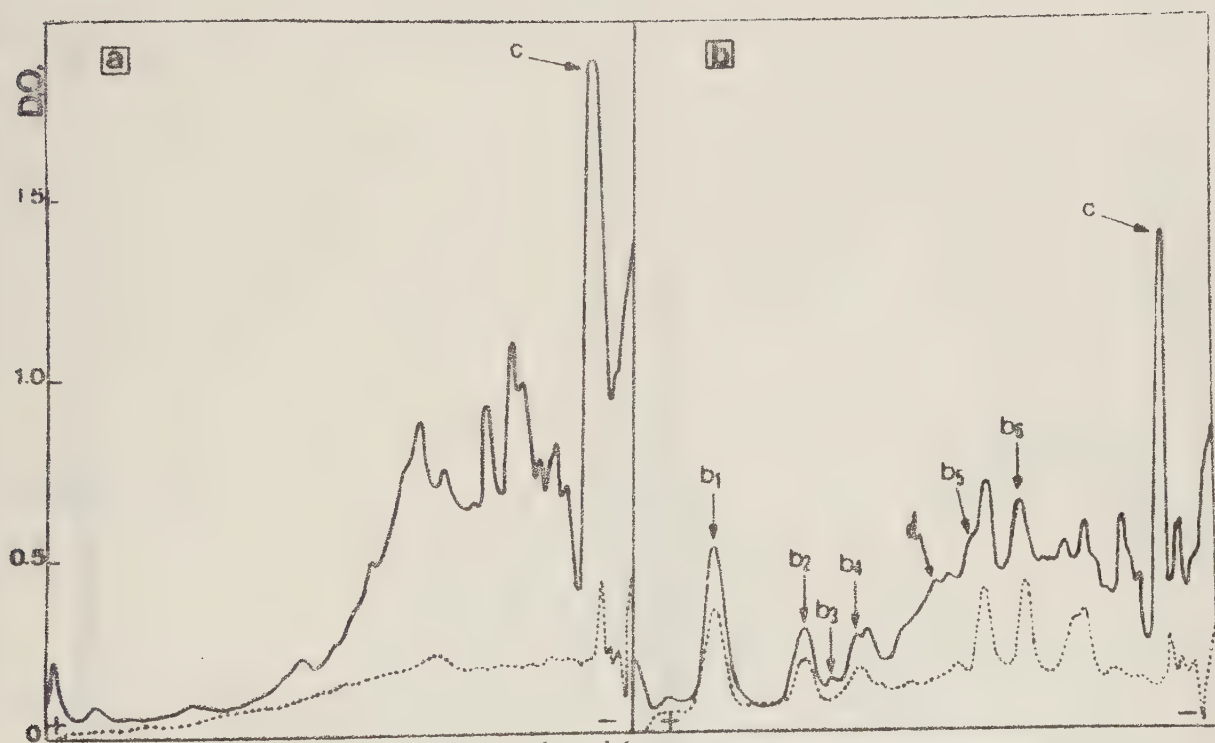


Fig. 10. - Electrophorèse des protéines solubles de Nicotiana Xanthi n. c.
 - a) sain à 20°C.
 - b) malade à 20°C, 10 jours après l'infection par le T.M.V. souche commune.
 (—) électrophorégramme de la solution complète. Pour détail voir fig. 1.
 (----) électrophorégramme de la fraction contenant les protéines "b" après passage sur gel de "Sephadex".

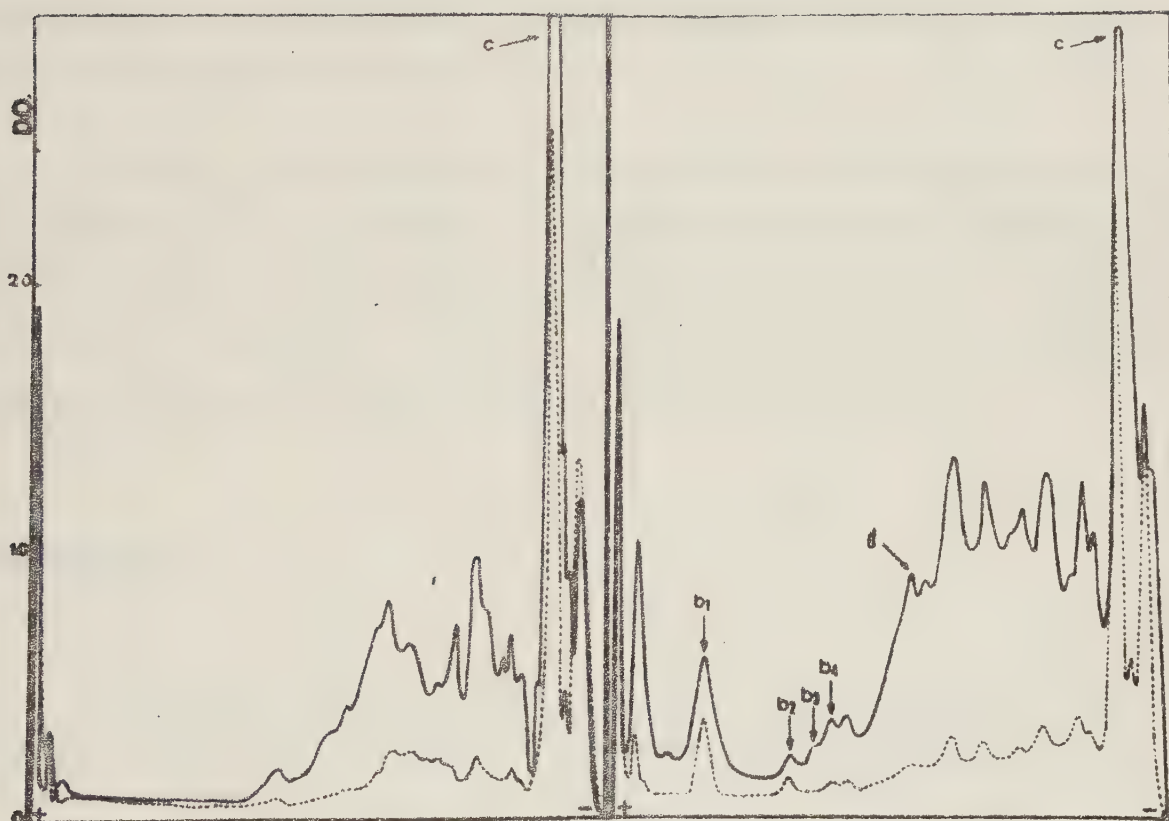


Fig. II. - Electrophorèse des protéines solubles de Nicotiana Xanthi n.c.
 - a) sain à 20°C.
 - b) malade à 20°C, 7 jours après l'infection par le T.M.V. souche commune.
 (—) électrophorégramme de gel fixé à l'acide acétique à 7 % et coloré au noir amido (absorption à 280 mμ)
 (-----) électrophorégramme de gel fixé à l'acide trichloracétique à 10 % (absorption à 280 mμ).
 Pour détail voir fig. I.

les cellules animales infectées par divers virus.

Pour expliquer le fait que la multiplication virale n'est plus inhibée lors du transfert thermique de 20°C à 32°C, on peut supposer que la levée de l'action d'un hypothétique répresseur, par élévation de la température, conduit à un déplacement de l'équilibre entre synthèse virale et synthèse du répresseur. Il est nécessaire qu'un autre équilibre entre ces deux facteurs s'établisse pour que l'arrêt de la synthèse virale puisse de nouveau avoir lieu. A la température élevée (32°C), ce nouvel équilibre chez l'hôte portant le gène N dit "d'hyper-sensibilité", n'est pas accompagné de la mort des cellules envahies ; rien ne distingue alors le comportement des tabacs porteurs de ce gène N de ceux qui sont sensibles (homozygotes nn).

Toutefois, étant données les limites des techniques utilisées, il n'est pas impossible que ces protéines "b" puissent être également présentes à l'état de trace chez les plantes saines. L'infection virale ne serait alors responsable que d'une forte activation de leur biosynthèse. Cela ne va pas à l'encontre de l'hypothèse que nous venons d'émettre. Des recherches en cours, affinant les techniques utilisées, lèveront peut-être prochainement ce doute.

REMERCIEMENTS.

Nous tenons à remercier particulièrement Madame Jacqueline RIGAUD et Monsieur Roland VERNOY pour l'assistance technique apportée à ce travail.

R E F E R E N C E S

- ALLARD, H.G. (1918). Mosaic disease of Phytolacca decandra. Phytopathology 8, 51.
- FAWDE, F.C. (1954). Inhibitors and plant viruses. Advances in Virus Research 11, 31.
- BLACK, L.M. (1939). Inhibition of virus activity by insect juices. Phytopathology 29, 321.
- BOZARTH, R.F. & ROSS, A.F. (1964). Systemic resistance induced by localized virus infections : extent of changes in uninfected plant parts. Virology 24, 446.
- BOUDON, E., MARTIN, C. & CARRE, M. (1970). Une souche Aucuba thermosensible du virus de la mosaïque du tabac. Comptes-rendus hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences 270, 2508, série D.
- CHADHA, K.C. & MAC NEILL, B.H. (1969). An antiviral principle from tomatoes systemically infected with tobacco mosaic virus. Canadian Journal of Botany 47, 513.
- DAVIS, B.J. (1964). Disc electrophoresis - II : Method and application to human serum proteins. Annals of the New York Academy of Sciences 121, 404.
- DUGGAR, B.M. & ARMSTRONG, J.K. (1925). The effect of treating the virus of tobacco mosaic with the juices from various plants. Annals of the Missouri Botanic Garden 12, 359.
- DULIEU, H. (1970). Communication personnelle.
- GIANINAZZI, S. , VALLEE, J.C. & MARTIN, C. (1969). Hypersensibilité aux virus, température et protéines solubles chez le Nicotiana Xanthi n.c. Comptes-rendus hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences 268, 800, série D.
- GIANINAZZI, S. & VALLEE, J.C. (1969). Température et synthèse de matériel protéique viral chez le Nicotiana Xanthi n.c. infecté par le virus de la mosaïque du tabac. Comptes-rendus hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences 269, 593, série D.
- GIANINAZZI, S., MARTIN, C. & VALLEE, J.C. (1970). Hypersensibilité aux virus, température et protéines solubles chez le Nicotiana Xanthi n.c.

Apparition de nouvelles macromolécules lors de la répression de la synthèse virale. Comptes-rendus hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences 270, 2383, série D.

GILPATRICK, J.D. & WEINTRAUB, M. (1952). An unusual type of protection with the carnation mosaic virus. Science, New York 115, 701.

GRANT, T.J. (1934). The host range and behaviour of the ordinary tobacco mosaic virus. Phytopathology 24, 311.

JOHNSON, J. & HOGGAN, I.A. (1937). The inactivation of the ordinary tobacco mosaic virus by microorganism. Phytopathology 27, 1014.

KIMMINS, W.C. (1969). Isolation of a virus inhibitor from plants with localized infections. Canadian Journal of Botany 47, 1879.

LOEBENSTEIN, G. (1960). Native protein, an immunizing agent against virus infection. Natura, London 185, 122.

LOEBENSTEIN, G. (1963). Further evidence on systemic resistance induced by localized necrotic virus infections in plants. Phytopathology 53, 306.

LOEBENSTEIN, G. & ROSS, A.F. (1963). An extractable agent, induced in uninfected tissues by localized virus infections, that interferes with infection by tobacco mosaic virus. Virology 20, 507.

LOEBENSTEIN, G., RABINA, S. & VAN PRAAGH, T. (1966). Induced interference phenomena in virus infections. In Viruses of plants. Edited by A.B.R. Beemster and J. Dijkstra. North-Holland Pub. Co., Amsterdam.

LOEBENSTEIN, G., RABINA, S., & VAN PRAAGH, T. (1968). Sensitivity of induced localized acquired resistance to actinomycin D. Virology 34, 264.

MARTIN, C. & GALLET, M. (1966 a). Hypersensibilité aux virus, température et induction florale chez les végétaux. Comptes-rendus hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences 262, 997, série D.

MARTIN, C. & GALLET, M. (1966 b). Nouvelles observations sur le phénomène d'hypersensibilité aux virus chez les végétaux. Comptes-rendus hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences 263, 1316, série D.

ORSTEIN, L. (1964). Disc electrophoresis - I : Background and theory. Annals of the New York Academy of Sciences 121, 321.

RAGETLI, H.W.J. (1957). Onderzoekingen over een virus remstof voorkomend in Dianthus caryophyllus. Tijdschrift over Plantenziekten 63, 245.

- ROSS, A.F. (1961 a). Localized acquired resistance to plant virus infection in hypersensitive hosts. Virology 14, 329.
- ROSS, A.F. (1961 b). Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. Virology 14, 340.
- SELA, I. & APPLEBAUM, S.W. (1962). Occurrence of antiviral factor in virus infected plants. Virology 17, 543.
- SELA, I., HARPAZ, I. & BIRK, Y. (1966). Identification of the active component of an antiviral factor isolated from virus infected plants. Virology 28, 71.
- SELA, B., LOEBENSTEIN, G. & VAN PRAAGH, T. (1969). Increase of tobacco mosaic virus multiplication and lesion size in hypersensitive hosts in the presence of chloramphenicol. Virology 39, 260.
- SIGNORET, P. (1964). Mise en évidence, chez certains Bivalves marins, de systèmes inhibiteurs agissant sur le virus de la mosaïque du Tabac. Comptes-rendus hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences, 259, 13,3892.
- STAPLES, R.C. & STAHMANN, M.A. (1964). Changes in proteins and several enzymes in susceptible bean leaves after infection by the bean rust fungus. Phytopathology 54, 760.
- VAN KAMMEN, A., NOORDAM, D. & THUNG, T.H. (1961). The mechanism of inhibition of infection with tobacco mosaic virus by an inhibitor from carnation sap. Virology 14, 100.
- VAN LOON, L.C. & VAN KAMMEN, A. (1970). Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from Nicotiana tabacum var. Samsun and Samsun NN. II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. Virology 40, 199.
- WEINTRAUB, M. & KEMP, W.C. (1961). Protection with carnation mosaic virus in Dianthus barbatus. Virology 13, 256.
- YARWOOD, C.E. (1953). Acquired resistance to tobacco mosaic virus in bean (Abstr.). Phytopathology 43, 490.
- YARWOOD, C.E. (1960). Localized acquired resistance to tobacco mosaic virus. Phytopathology 50, 741.

C O M P L E M E N T II

-:-:-:-:-:-:-

Comme nous venons de le montrer, nous avons pu mettre en évidence la biosynthèse d'un groupe de protéines nouvellement codées par l'hôte, accompagnant la répression de la multiplication virale. Nous avons alors tenté d'inhiber leur biosynthèse à l'aide du chloramphénicol. Pour cela, nous avons fait absorber par le pétiole à des feuilles de Nicotiana tabacum var. Xanthi n.c., détachées de la plante immédiatement après l'inoculation par le V.M.T., une solution de chloramphénicol (150 mg/l). On sait que cet antibiotique est un inhibiteur de synthèse protéique. Des témoins inoculés absorbent de l'eau et d'autres, non inoculés, soit de l'eau, soit du chloramphénicol. Ce type d'expérience permet de montrer que l'infection se déroule différemment selon que les feuilles absorbent de l'eau ou du chloramphénicol. Dans ce dernier cas, la nécrose continue à s'agrandir jusqu'à la mort de la feuille inoculée survenant six à sept jours après le début de l'expérience. Si le nombre de nécroses n'est pas trop élevé (5 ou 6), leur convergence ne peut pas avoir lieu dans les trois ou quatre jours qui suivent l'inoculation, il devient alors possible de prélever le tissu vivant qui les entoure (fig. 1). L'électrophorégramme des protéines solubles de ces tissus ne révèle pas la présence de protéines "b". Par contre, si la feuille a absorbé de l'eau, l'infection se déroule normalement, la synthèse de ces nouvelles protéines a lieu et leur présence est bien visible sur l'électrophorégramme (fig. 2). Les témoins non inoculés se maintiennent en bon état pendant toute la durée de l'expérience. L'analyse de leurs protéines solubles ne révèle aucune variation qualitative, seule une diminution quantitative est mise en évidence. Ces expériences semblent montrer une corrélation entre l'augmentation de la taille de la nécrose et l'inhibition de la synthèse des protéines "b".

Cette sensibilité de la réaction hypersensible au chloramphénicol, déjà signalée par Sela, Loebenstein et Van Praagh (1969) indique bien que l'arrêt du processus nécrotique dépend de la synthèse de nouvelles molécules qui sont inhibées par la présence de l'antibiotique. De plus, toujours selon Sela et coll., la résistance acquise des tissus entourant la nécrose



Fig. 1 - Feuilles de *Nicotiana tabacum* var. *Xanthi* n. c. inoculées avec le V.M.T. à 20°C, dont le pétiole est plongé :

- a) dans de l'eau depuis 4 jours.
- b) dans du chloramphénicol depuis 4 jours.

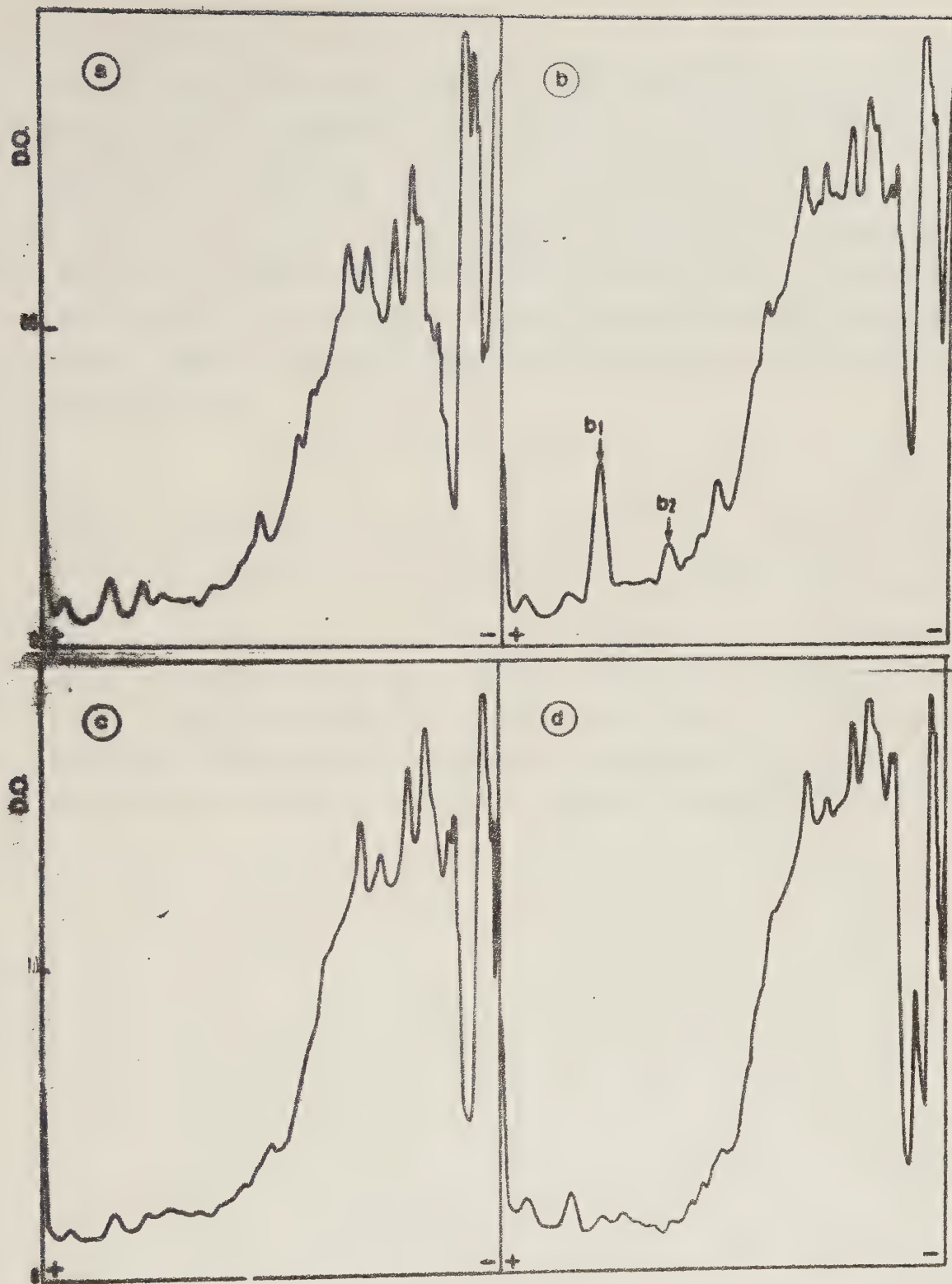


Fig. 2. - Electrophorèse des protéines solubles de feuilles de Nicotiana tabacum var. Xanthi n.c. à 20°C :

- a) saine : absorbant de l'eau depuis 4 jours.
- b) infectée avec le V.M.T. et absorbant de l'eau depuis 4 jours.
- c) saine : absorbant du chloramphénicol depuis 4 jours.
- d) infectée avec le V.M.T. et absorbant du chloramphénicol depuis 4 jours.

disparaît chez les feuilles traitées au chloramphénicol, tandis que leur pouvoir infectieux augmente avec la taille de la nécrose. Comme Martin (1966) a montré que la formation des lésions locales nécrotiques est corrélative d'une étape tardive de la multiplication virale, il est tentant d'en donner l'explication suivante : le chloramphénicol empêchant la synthèse des protéines "b", l'arrêt de la multiplication virale ne peut avoir lieu et la nécrose peut ainsi continuer à s'agrandir parallèlement à la progression virale. D'autres expériences sont nécessaires pour pouvoir confirmer ou non cette hypothèse.

Nota : L'analyse des graphiques donnés dans la fig. 2 montre sur l'électrophorégramme des feuilles saines la présence de quelques petits pics au niveau des bandes "b" et, en particulier, au niveau de la "b_I". Comme le pouvoir de résolution de ces dernières électrophorèses a été sensiblement amélioré, il pourrait s'agir de la démonstration que ces protéines existent aussi en faible quantité chez la plante saine. Mais les conditions particulièrement différentes de ces dernières expériences (Feuilles détachées de la plante) ne nous autorisent pas à tirer des conclusions aussi hâtives.

Le déclenchement de la réaction d'hypersensibilité par transfert thermique ne provoque pas de diminution du "trimère" avant l'apparition de symptômes nécrotiques ; par la suite, sa quantité diminue progressivement, parallèlement à celle des protéines totales. Des études réalisées avec l'hôte maintenu toujours en condition d'hypersensibilité montre aussi que la synthèse du "trimère", bien que faiblement active, est néanmoins réelle.

Les observations au microscope électronique effectuées par Martin et coll. (1969) semblent révéler que les cellules vivantes entourant la nécrose présentent des particules virales incomplètes dont l'acide nucléique n'est que partiellement recouvert.

La synthèse de la protéine de la capside est donc arrêtée pendant la réaction d'hypersensibilité, mais seulement après l'apparition de la nécrose. Le mécanisme bloquant l'une ou l'autre des étapes conduisant au virion complet n'est donc pas le même que celui responsable de la réaction nécrotique. Sa nature exacte n'est pas encore connue, mais nous savons qu'il est thermosensible (Samuel 1931, Martin et Gallet 1966 a, b et c). Il n'est évidemment plus question d'invoquer l'existence d'une barrière de cellules mortes.

b) Protéines de l'hôte : L'analyse à l'aide de leucine radioactive des conséquences de l'infection systémique (généralisée) sur le métabolisme protéique de l'hôte ne nous a montré aucune différence qualitative importante. Il apparaît simplement que la synthèse des protéines cellulaires diminue de 20 à 40 % dans les feuilles malades. Mais comme la synthèse des protéines virales est très intense, il en résulte une protéosynthèse totale plus importante chez les feuilles malades que chez les feuilles saines. Cette augmentation qui se chiffre entre 20 et 30 % est du même ordre de grandeur que celle constatée par Diringier, Anderer et Schramm (1967). Par contre, ces auteurs n'ont constaté aucune diminution des protéines cellulaires normales. Pour notre part, nous montrons que, même lorsque l'infection ne produit que des symptômes légers, elle peut inhiber partiellement la synthèse des protéines cellulaires normales. La traduction des ARN messagers cellulaires est ralentie au profit de l'ARN viral, mais un mécanisme de régulation in-

connu limite ce phénomène à un niveau compatible avec la survie des cellules infectées.

Le déclenchement de la réaction hypersensible par transfert thermique ne provoque pas de diminution ultérieure dans la quantité des protéines solubles avant l'apparition de la nécrose. L'emploi de leucine radioactive montre que le marquage des protéines solubles diminue en même temps que celui des protéines totales. L'inhibition de synthèse à la suite du déclenchement de la réaction hypersensible intéresse donc à la fois les protéines solubles, les protéines insolubles et, comme nous l'avons vu, les capsomères viraux. L'inhibition de protéosynthèse n'est donc pas spécifique d'une catégorie de protéines. Comme cette diminution de la protéosynthèse ne se manifeste pas avant l'apparition des symptômes nécrotiques, elle ne paraît pas jouer un rôle primordial dans la mort des cellules infectées. Toutefois, cela ne permet pas d'écarter la possibilité que la biosynthèse ou l'activité, d'une ou plusieurs protéines cellulaires - phénomène indécélable par les techniques que nous avons utilisées - soit modifiée sélectivement à un stade précoce de la réaction hypersensible.

c) Protéines nouvellement codées : Nous avons pu mettre en évidence pendant la réaction d'hypersensibilité l'apparition de nouvelles protéines. Celles-ci sont activement synthétisées par les cellules entourant la nécrose et on ne peut pas les détecter avant que cette dernière n'apparaisse. On peut cependant montrer la présence de certaines d'entre-elles lors d'une infection systémique en fin de multiplication virale et aussi dans le tissu présentant une "immunité acquise". Le fait que nous les trouvons aussi dans les tissus non infectieux d'une plante malade, permet de supposer soit qu'elles ont diffusé des cellules malades vers les cellules saines, soit qu'elles ont été synthétisées par les cellules saines sous l'influence d'une "induction" venant de cellules malades. Nous ne détectons ces protéines que lorsque la répression de la synthèse virale est opérante, tant dans les cas d'hypersensibilité que de sensibilité (infection généralisée). Il est possible qu'elles jouent un rôle à ce niveau, mais nous n'avons pas pu vérifier jusqu'à présent cette hypothèse. Si leur rôle est bien d'arrêter la multiplication virale, nous pouvons alors les comparer à l'interféron. Van Loon et Van Kammen (1970) qui ont aussi mis en évidence des nouvelles protéines

lors de la réaction hypersensible ont plutôt tendance à les considérer comme une simple déviation de métabolisme. Il faut toutefois noter qu'ils n'ont pas pu les mettre en évidence lors d'une infection systémique. Mais les expériences avec le chloramphénicol qui ont permis d'inhiber leur biosynthèse, en même temps que la nécrose s'agrandissait, semblent plutôt confirmer notre hypothèse.

L'inhibition par élévation de la température de la réaction hypersensible permet la reprise de la multiplication virale malgré la présence, même en forte quantité de ces nouvelles protéines dans les tissus entourant la nécrose. Il n'y a là rien d'étonnant car, comme nous le savons, la répression de la multiplication virale est thermosensible. Il est donc possible que l'élévation de température empêche les protéines "b" bien que présentes, d'accomplir leur éventuelle fonction inhibitrice.

B I B L I O G R A P H I E

- ALLARD, H.G. (1918). Mosaic disease of Phytolacca decandra. Phytopathology 8, 51.
- BANDEN, F.C. (1954). Inhibitors and plant viruses. Advances in Virus Research II, 31.
- BANDEN, F.C. (1964). Plant viruses and virus diseases. The Ronald Press Company, New York.
- BALTIMORE, D., BECKER, Y. & DARNELL, J.E. (1964). Virus - specific double stranded RNA in poliovirus infected cells. Science 143, 1034.
- BALTIMORE, D. & FRANKLIN, R.M. (1962). Preliminary data on a virus specific enzyme system responsible for the synthesis of viral RNA. Biochem. Biophys. Res. Communic. 9, 388.
- BIELESKI, R.L. & YOUNG R.E. (1963). Extraction and separation of phosphate esters from plant tissues. Analytical Biochemistry 6, 154.
- BIFFEN, R. H. (1907). Studies in the inheritance of disease resistance. J. Agr. Sci. 2, 109.
- BLACK, L. M. (1939). Inhibition of virus activity by insect juices. Phytopathology 29, 321.
- BOUDON, E., MARTIN, C. & CARRE, M. (1970). Une souche Aucuba thermosensible du virus de la mosaïque du tabac. Comptes-rendus hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences 270, 2508, série D.
- BOZARTH, R.F. & ROSS, A.F. (1964). Systemic resistance induced by localized virus infections : extent of changes in uninfected plant parts. Virology 24, 446.
- CABANNE, F., SCALLA, R. & MARTIN, C. (1968). Activité de la polyphénoloxydase au cours de la réaction d'hypersensibilité chez Nicotiana Xanthi n. c. infecté par le virus de la mosaïque du tabac. Annales de Physiologie Végétale 10, 199.
- CHADHA, K.C. & MAC NEILL, B.H. (1969). An antiviral principle from tomatoes systemically infected with tobacco mosaic virus. Canadian Journal of Botany 47, 513.

- DAVIS, B.J. (1964). Disc electrophoresis - II - Method and application to human serum proteins. Annals of New York Academy of Sciences 121, 404.
- DIRINGER, H., ANDERER, F.A. & SCHRAMM, G. (1967). Wachstumsgeschwindigkeit der Peptidkette im Tabakmosaikvirus. Zeitschrift für Naturforschung 22 B, 1280
- DUGGAR, B.M. & ARMSTRONG, J.K. (1925). The effect of treating the virus of tobacco mosaic with the juices from various plants. Annals of the Missouri Botanic Garden 12, 359.
- DULIEU, H. (1970). Communication personnelle.
- FARKAS, G.L. (1967). A comparison of Biochemical Changes Associated with Virus-Induced lesion Formation and Mechanical Injury. Proceeding of the International Symposium on Plant Biochemical Regulation in viral and Other Diseases or Injury. Tokyo, 123.
- FARKAS, G.L., KIRALY, Z. & SOLYMOSY, F. (1960). Role of oxidative metabolism in the localization of plant viruses. Virology 12, 408.
- FARKAS, G.L., SOLYMOSY, F. & LOVREKOVICH, L. (1965). The role of altered enzyme levels in the regulation of metabolic pattern in diseased plant tissues. Tagungsber. DAL zu Berlin 74, 71.
- GIANINAZZI, S., VALLEE, J.C. & MARTIN, C. (1969). Hypersensibilité aux virus, température et protéines solubles chez le Nicotiana Xanthi n. c. Comptes-Rendus hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences 263, 800, série D.
- GIANINAZZI, S. & VALLEE, J.C. (1969). Température et synthèse de matériel protéique viral chez le Nicotiana Xanthi n. c. infecté par le virus de la mosaïque du tabac. Comptes-rendus hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences 269, 593, série D.
- GIANINAZZI, S., MARTIN, C. & VALLEE, J.C. (1970). Hypersensibilité aux virus, température et protéines solubles chez le Nicotiana Xanthi n. c. Apparition de nouvelles macromolécules lors de la répression de la synthèse virale. Comptes-rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des Sciences 270, 2383, série D.
- GIANINAZZI, S., SCALLA, R. & RIGAUD, J. (1970). Biosynthèse de la capside du virus de la mosaïque du tabac chez le Nicotiana Xanthi n. c. à 32°C. Comptes-Rendus hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences 270, série D, 2882.

- GILPATRICK, J.D. & WEINTRAUB, M. (1952). An unusual type of protection with the carnation mosaic virus. Science, New York 115, 701.
- GRANT, T.J. (1934). The host range and behaviour of the ordinary tobacco mosaic virus. Phytopathology 24, 311
- HIRAI, A. & WILDMAN, S.G. (1967). Intracellular site of assembly to TMV-RNA and protein. Virology 33, 467.
- HARUNA, I., NOZU, K., OHTAKA, Y. & SPIEGELMAN, S. (1963). An RNA "replicase" induced by and selective for a viral RNA : Isolation and properties. Proc. nation. Acad. Sci., U.S.A. 50, 905.
- HOLMES, F.O. (1938). Inheritance of resistance to tobacco mosaic disease in tobacco. Phytopathology 28, 553.
- JOCKUSH, H. (1966). The role of host genes, temperature and polyphenoloxylase in the necrotization of TMV infected tobacco tissue. Phytopathologische Zeitschrift 55, 185.
- JOHNSON, J. & HOGGAN, I.A. (1937). The inactivation of the ordinary tobacco mosaic virus by microorganism. Phytopathology 27, 1014.
- KASSANIS, B. (1952). Some effects of high temperature on the susceptibility of plant to infection with viruses. Annals of Applied Biology 39, 358.
- KIMMINS, W.C. (1969). Isolation of a virus inhibitor from plants with localized infections. Canadian Journal of Botany 47, 1879.
- LADYGINA, M.E., RUBIN, B.A. & TUKEEVA, M.I. (1966). Effect of Tobacco Mosaic virus on Energy Metabolism of Tobacco Species Differing in Respect to Resistivity. Soviet Plant Physiology, 13.
- LEBEURIER, G. & BADRE, M.L. (1963). Effets de diverses températures sur la cinétique du développement du virus de la mosaïque du tabac. Comptes-rendus hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences 257, groupe 13, 2559.
- LOEBENSTEIN, G. (1960). Native protein, an immunizing agent against virus infection. Natura, London 185, 122.
- LOEBENSTEIN, G. (1963). Further evidence on systemic resistance induced by localized necrotic virus infections in plants. Phytopathology 53, 306.
- LOEBENSTEIN, G. & LINSEY, N. (1963). Effect of virus infection on peroxidase activity and C_6 / C_1 ratios. Phytopathology 53, 350.

- LOEBENSTEIN, G. & ROSS, A.F. (1963). An extractable agent, induced in uninfected tissues by localized virus infections, that interferes with infection by tobacco mosaic virus. Virology 20, 507.
- LOEBENSTEIN, G., RABINA, S. & VAN PRAAGH, T. (1966). Induced interference phenomena in virus infections. In viruses of plants. Edited by A.B.R. Beemster and J. Dijkstra. North-Holland Pub. Co., Amsterdam.
- LOEBENSTEIN, G., RABINA, S., & VAN PRAAGH, T. (1968). Sensitivity of induced localized acquired resistance to actinomycin D. Virology 34, 264.
- MAC CARTHY, D. (1968). Separation of the stable Aggregates of TMV protein by Electrophoresis on Polyacrylamide Gels. J. Gen. Virology 3, 417.
- MARTIN, C. (1958). Etude de quelques déviations du métabolisme chez les plantes atteintes de maladies à virus. Thèse de doctorat ès-sciences naturelles, Paris.
- MARTIN, C. (1966). Contribution à l'étude du phénomène d'hypersensibilité au virus de la Mosaïque du tabac. Bull. Soc. Franç. Physiol. Végét. 12, 345.
- MARTIN, C. & GALLET, M. (1966) a). Contribution à l'étude de l'action de la température sur la réaction d'hypersensibilité de certains hôtes à l'égard du virus de la mosaïque du tabac. Comptes-rendus hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences, Paris 262, série D, 646.
- MARTIN, C. & GALLET, M. (1966 b). Hypersensibilité aux virus, température et induction florale chez les végétaux. Comptes-rendus hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences, Paris 262, série D, 997.
- MARTIN, C. & GALLET, M. (1966 c). Nouvelles observations sur le phénomène d'hypersensibilité aux virus chez les végétaux. Comptes-rendus hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences, Paris 263, série D, 1316.
- MARTIN, C. SCALLA, R. MEIGNOZ, R. & GALLET, M. (1969). Etude au microscope électronique, chez le Nicotiana Xanthi n. c., des cellules vivantes situées au voisinage d'une lésion nécrotique d'hypersensibilité au virus de la mosaïque du tabac. Comptes-rendus hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences, Paris 268, série D, 2183.
- MILNE, R.G. (1966). Electron microscopy of tobacco mosaic virus in leaves of Chenopodium Amaranticolor. Virology 28, 520.
- MONGAGNIER, L. & SANDERS, F.K. (1963). Replicative form of encephalomyocarditis virus ribonucleic acid. Nature 199, 664.

- MOREL, G. & MARTIN, C. (1952). Guérison de Dahlias atteints d'une maladie à virus. Comptes-rendus hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences, Paris 235, 1324.
- ORNSTEIN, L. (1964). Disc electrophoresis - I : Background and theory - Annals of the New York Academy of sciences 121, 321.
- PLAGEMANN, P.G. & SWIM, H.E. (1966). Replication of Mengo virus. I. Effect on synthesis of macromolecules by host cell. Journal of bacteriology 91, 2317.
- RAGETLI, H.W.J. (1957). Onderzoekingen over een virus remstof voorkomend in Dianthus caryophyllus. Tijdschrift over Plantenziekten 63, 245.
- RAGETLI, H.W.J. (1967). Virus-host interactions, with emphasis on certain cytopathic phenomena. Can. J. Botany 45, 1221.
- ROSS, A.F. (1961 a). Localized acquired resistance to plant virus infection in hypersensitive hosts. Virology 14, 329.
- ROSS, A.F. (1961 b). Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. Virology 14, 340.
- ROSS, A.F. (1966). Viruses of Plants, North Holland, Publ. Co. Amsterdam, 127.
- SAMUEL, G. (1931). Some experiments on inoculating methods with plant viruses and local lesions. Annals of Applied Biology 18, 494.
- SARKAR, S. & JOCKUSH, H. (1968). Wild. Type and defective coat proteins of tobacco mosaic virus : electrophoretic analysis of plant extracts in polyacrylamide gels. Biochim. Biophys. Acta 160, 259.
- SCALLA, R. & MEIGNOZ, R. (1967). Quelques effets d'une infection par le virus de la mosaïque du tabac sur le métabolisme du phosphore chez Nicotiana Xanthi n. c. Annales de Physiologie Végétale 9, 383.
- SCALLA, R., MEIGNOZ, R., NOIROT-TIMOTHEE, C. & MARTIN, C. (1969). Etude au microscope électronique des premiers stades des altérations des chloroplastes chez le Nicotiana Xanthi n. c. au cours de la réaction hypersensible au virus de la mosaïque du tabac. Comptes-rendus hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences. Paris 268, série D, 527.
- SCALLA, R., RIGAUD, J. & MARTIN, C. (1970). Respiration et photosynthèse chez Nicotiana Xanthi n. c. au cours de la réaction d'hypersensibilité au virus de la mosaïque du tabac. Physiologie Végétale (sous presse).

- SCHRAMM, G. (1943). Über die Spaltung des Tabak Mosaic Virus in nieder Moleculare Protein inst die Rückbildung hoch Moleculären Protein aus dem Spaltstücken. Naturwissenschaften 31, 94.
- SELA, I. & APPLEBAUM, S. W. (1962). Occurrence of antiviral factor in virus infected plants. Virology 17, 543.
- SELA, I., HARPAZ, I. & BIRK, Y. (1966). Identification of the active component of an antiviral factor isolated from virus infected plants. Virology 28, 71.
- SELA, B., LOEBENSTEIN, G. & VAN PRAAGH, T. (1969). Increase of tobacco mosaic virus multiplication and lesion size in hypersensitive hosts in the presence of chloramphenicol. Virology 39, 260.
- SIGNORET, P. (1964). Mise en évidence, chez certains Bivalves marins, de systèmes inhibiteurs agissant sur le virus de la mosaïque du Tabac. Comptes-rendus hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences, Paris 259, 13, 3892.
- SOLYMOSY, F. & FARKAS, G.L. (1963). Metabolic Characteristics at the Enzymatic Level of Tobacco Tissues Exhibiting Localized Acquired Resistance to Viral Infection. Virology 21, 210.
- STAHMANN, M.A. (1965). The biochemistry of proteins of the host and parasite in some plant diseases. Tagungsber. DAL zu Berlin 74, 9.
- STAKMANN, E.C. (1914). A study in cereal rusts, physiological races. Univ. Minn. Agr. Expt. Sta. Bull. 138.
- STAKMANN, E.C. (1915). Relation between Puccinia graminis and plants highly resistant to its attack. J. Agr. Research 4, 193.
- STAPLES, R.C. & STAHMANN, M.A. (1964). Changes in proteins and several enzymes in susceptible bean leaves after infection by the bean rust fungus. Phytopathology 54, 760.
- STEPHENSON, M.L., THIMANN, K.V. & ZAMECNIK, P.C. (1956). Incorporation of C¹⁴-amino acids into proteins of leaf disks and cell-free fractions of tobacco leaves. Archives of biochemistry and biophysics 65, 194.
- SUNDERLAND, D.W. & MERRETT, M.J. (1967). Respiration rate, adenosine diphosphate and triphosphate concentration of leaves showing necrotic local lesions following infection by tobacco mosaic virus. Physiologie Plantarum 20, 368.
- TANIGUCHI, M. (1969). The trimer-disc Transformation of TMV-protein. Biochim. Biophys. Acta 181, I, 244.

- TANGUY, J. (1970). Quelques aspects du métabolisme des composés phénoliques chez les Nicotiana hypersensibles au virus de la mosaïque du tabac souche commune. Thèse de doctorat ès-sciences naturelles, Paris.
- TAKAHASHI, W.N. & ISHII, M. (1953). A macromolecular protein associated with TMV infection : its isolation and properties. American J. Bot. 40, 85.
- URITANI, I. (1965). Molecular pathology in the plant field with special regard to defense action of the host. Tagungsberg. DAL zu Berlin 74, 201.
- VAN KAMMEN, A., NOORDAM, D. & THUNG, T.H. (1961). The mechanism of inhibition of infection with tobacco mosaic virus by an inhibitor from carnation sap. Virology 14, 100.
- VAN LOON, L.C. & VAN KAMMEN, A. (1970). Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from Nicotiana tabacum var. Samsun and Samsun NN II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. Virology 40, 199.
- VAN RYSELBERGE, C. & JEENER, R. (1957). Plant virus synthesis and the abnormal protein constituents of infected leaves. Biochimica et Biophysica Acta 23, 18.
- WARD, H.M. (1902). On the relations between host and parasite in the Bromes and their brown rust, Puccinia dispersa (Erikss.). Ann Botany, London 16, 233.
- WEINTRAUB, M. & KEMP, W.C. (1961). Protection with carnation mosaic virus in Dianthus barbatus. Virology 13, 256.
- WEINTRAUB, M., KEMP, W.C. & RAGETLI, H.W.J. (1960). Studies on the metabolism of leaves with localized virus infection. 1. Oxygen uptake. Can J. Microbiol. 6, 407.
- WEINTRAUB, M. & RAGETLI H.W.J. (1964). An electron microscope study of tobacco mosaic virus lesions in Nicotiana glutinosa L. J. Cell. Biol. 23, 499.
- WEISSMANN, C. (1965). Replication of viral RNA. VII - Further studies on the enzymatic replication of MS₂ RNA. Proc. nation. Acad. Sci., U.S.A. 54, 202.
- WEISSMANN, C., BORST, P., BURDON, R.E., BILLETER, M.A. & OCHOA, S. (1965). Replication of viral RNA. III. Double-stranded replicative form of MS₂ phage RNA. Proc. nation. Acad. Sci., U.S.A. 51, 682.
- WEISSMANN, C., SIMON, L. & OCHOA, S. (1963). Induction by an RNA phage of an enzyme catalysing incorporation of ribonucleic acid. Proc. nation. Acad. Sci., U.S.A. 49, 407.

- WOODS, A.F. (1899). The destruction of chlorophyll by oxidizing enzymes. Centralbl. f. bakt. Parasitenkunde 5, 745.
- YARWOOD, C.E. (1953). Acquired resistance to tobacco mosaic virus in bean (Abstr). Phytopathology 43, 490.
- YARWOOD, C.E. (1960). Localized acquired resistance to tobacco mosaic virus. Phytopathology 50, 741.

